

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 416**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2013 PCT/EP2013/001504**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174510**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2013 E 13724523 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2852408**

54 Título: **Terapia de combinación que involucra anticuerpos contra claudina 18.2 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

23.05.2012 WO PCT/EP2012/002210

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.10.2017

73 Titular/es:

GANYMED PHARMACEUTICALS GMBH (50.0%)

An der Goldgrube 12

55131 Mainz, DE y

TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES

GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ

GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;

TÜRECI, ÖZLEM;

MITNACHT-KRAUS, RITA;

JACOBS, STEFAN, DENIS;

UTSCH, MAGDALENA, JADWIGA;

HEINZ, CORNELIA, ADRIANA, MARIA y

STADLER, CHRISTIANE REGINA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 637 416 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia de combinación que involucra anticuerpos contra claudina 18.2 para el tratamiento del cáncer

- 5 Los cánceres del estómago y del esófago (gastroesofágicos, GE) se encuentran entre las neoplasias con la mayor necesidad médica no satisfecha. El cáncer gástrico es la segunda causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. La incidencia de cáncer de esófago ha aumentado en las últimas décadas, coincidiendo con un cambio en el tipo histológico y la ubicación del tumor primario. El adenocarcinoma del esófago es ahora más prevalente que el carcinoma de células escamosas en los Estados Unidos y Europa occidental, con la mayoría de los tumores ubicados en el esófago distal. La tasa global de supervivencia a cinco años para el cáncer GE es del 20 al 25%, a pesar de la agresividad del tratamiento estándar establecido asociado con efectos secundarios sustanciales.
- 10 La mayoría de los pacientes presentan una enfermedad localmente avanzada o metastásica y tienen que someterse a quimioterapia de primera línea. Los regímenes de tratamiento se basan en una cadena principal de derivados de platino y fluoropirimidina combinados en su mayoría con un tercer compuesto (por ejemplo, taxano o antraciclinas). Sin embargo, la supervivencia media libre de progresión de 5 a 7 meses y la supervivencia global media de 9 a 11 meses son lo mejor que se puede esperar.
- 15 La falta de un beneficio importante de los diversos regímenes de quimioterapia de combinación de nueva generación para estos cánceres ha estimulado la investigación en el uso de agentes dirigidos. Recientemente, para los cánceres gastroesofágicos Her2/neu positivos, ha sido aprobado Trastuzumab. Sin embargo, como sólo ~20% de los pacientes expresan el objetivo y son elegibles para este tratamiento, la necesidad médica sigue siendo alta.
- 20 Varios documentos del estado de la técnica sugieren una terapia de combinación de anticuerpos y agentes citotóxicos. Por ejemplo, el documento del estado de la técnica WO2011/090005 describe el tratamiento de pacientes que padecen un cáncer colorrectal con una combinación de irinotecano y un anticuerpo contra A33, una proteína de membrana tipo I y un marcador tumoral. El documento del estado de la técnica WO2010/009794 describe el tratamiento de células cancerosas esófago-gástricas con anticuerpos contra EGFR en combinación con epirrubicina, cisplatino y capecitabina. El documento del estado de la técnica Kobunai et al., 2011 (Anticancer Res. 31: 3691-3696) describe el uso de anticuerpos dirigidos a EGFR en combinación con 5-FU.
- 25 La molécula de unión estrecha claudina 18 variante de empalme 2 (claudina 18.2 (CLDN18.2)) es un miembro de la familia de las claudinas de proteínas de unión estrecha. CLDN18.2 es una proteína transmembrana de 27,8 kDa que comprende cuatro dominios que abarcan la membrana con dos pequeños bucles extracelulares.
- 30 En tejidos normales no hay expresión detectable de CLDN18.2 por RT-PCR con excepción del estómago. La inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para CLDN18.2 revela al estómago como el único tejido positivo.
- 35 CLDN18.2 es un antígeno de linaje gástrico altamente selectivo expresado exclusivamente en células epiteliales gástricas diferenciadas de corta vida. CLDN18.2 se mantiene en el curso de la transformación neoplásica y, por lo tanto, se muestra con frecuencia en la superficie de las células de cáncer gástrico humano. Además, este antígeno pan-tumoral se activa ectópicamente a niveles significativos en los adenocarcinomas esofágicos, pancreáticos y pulmonares. La proteína CLDN18.2 también está localizada en metástasis de ganglios linfáticos de adenocarcinomas de cáncer gástrico y en metástasis distantes especialmente en el ovario (los llamados tumores de Krukenberg).
- 40 El anticuerpo quimérico IgG1 IMAB362 que está dirigido contra CLDN18.2 ha sido desarrollado por Ganymed Pharmaceuticals AG. IMAB362 reconoce el primer dominio extracelular (ECD1) de CLDN18.2 con alta afinidad y especificidad. IMAB362 no se une a ningún otro miembro de la familia de la claudina incluyendo la variante de empalme 1 estrechamente relacionada de claudina 18 (CLDN18.1). IMAB362 muestra la especificidad exacta de las células tumorales y agrupa cuatro mecanismos de acción altamente potentes independientes. Al fijar el objetivo, IMAB362 media la muerte celular por ADCC, CDC y la inducción de la apoptosis inducida por entrecruzamiento del objetivo en la superficie de la célula tumoral y la inhibición directa de la proliferación. Por lo tanto, IMAB362 lisa eficientemente las células positivas para CLDN18.2, incluyendo las líneas celulares de cáncer gástrico humano *in vitro* e *in vivo*. Los ratones que portan líneas celulares cancerosas positivas para CLDN18.2 tienen un beneficio de supervivencia y hasta el 40% de ratones muestran regresión de su tumor cuando se tratan con IMAB362.
- 45 La toxicidad y el perfil de PK/TK de IMAB362 se han examinado minuciosamente en ratones y monos cynomolgus incluyendo estudios de determinación de rango de dosis, estudios de toxicidad de dosis repetidas de 28 días en cynomolgus y un estudio de toxicidad de dosis repetidas de 3 meses en ratones. Tanto en ratones (administración semanal de duración más larga de tratamiento durante 3 meses, niveles de dosis más altas de 400 mg/kg) como en monos cynomolgus (hasta 5 aplicaciones semanales de hasta 100 mg/kg), dosis repetidas de IMAB362 en forma iv son bien toleradas. No se induce ningún signo de toxicidad sistémica o local. Específicamente, no se ha observado toxicidad gástrica en ningún estudio de toxicidad. IMAB362 no induce activación inmune ni liberación de citoquinas. No se registraron efectos adversos en los órganos reproductores masculinos o femeninos. IMAB362 no se une a los tejidos
- 50

que carecen del objetivo. Los estudios de biodistribución en ratones indican que la razón de la falta de toxicidad gástrica es muy probablemente la compartimentalización de uniones estrechas en el sitio luminal en epitelios gástricos sanos, lo que parece afectar la accesibilidad del epítipo IMAB362 profundamente. Esta compartimentalización se pierde tras una transformación neoplásica que hace que el epítipo pueda ser modificado farmacológicamente por IMAB362.

5 El IMAB362 se encuentra en las primeras pruebas clínicas. Se ha realizado un estudio clínico de fase I en seres humanos. 5 cohortes de dosis (33 mg/m², 100 mg/m², 300 mg/m², 600 mg/m², 1.000 mg/m²) de 3 pacientes recibieron cada uno una sola administración intravenosa de IMAB362 y se han observado durante 28 días. IMAB362 fue muy bien tolerado, sin observación de seguridad relevante en los pacientes. En un paciente, todos los marcadores tumorales medidos disminuyeron significativamente en las 4 semanas posteriores al tratamiento. En un estudio clínico de fase IIa en curso, se administra repetidamente IMAB362.

10 En el presente documento se presentan datos que demuestran que los agentes quimioterapéuticos pueden estabilizar o incrementar la expresión de CLDN18.2 en la superficie de células cancerosas lo que da como resultado una capacidad de tratamiento mejorada del fármaco CLDN18.2 por un anticuerpo anti-CLDN18.2 tal como IMAB362. Se observó un efecto sinérgico de un anticuerpo anti-CLDN18.2 tal como IMAB362 con regímenes quimioterapéuticos particulares, en particular regímenes quimioterapéuticos usados para el tratamiento del cáncer gástrico o tratamiento de cánceres humanos sólidos. Las células cancerosas humanas previamente tratadas con quimioterapia son más susceptibles a la muerte específica objetivo inducida por anticuerpos. En los modelos de tumores de ratón, el control del tumor con un anticuerpo anti-CLDN18.2 más quimioterapia es superior al de un anticuerpo anti-CLDN18.2 como agente único.

15 Además, los datos presentados aquí indican que bifosfonatos tales como el ácido zoledrónico (ZA), en particular cuando se administran conjuntamente con interleuquina 2 recombinante (IL-2), aumentan adicionalmente la actividad de un anticuerpo anti-CLDN18.2 tal como IMAB362. El mecanismo subyacente es la activación y expansión de una población de células inmunes altamente citotóxicas (células T γδ2).

Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona generalmente una terapia de combinación para tratar y/o prevenir eficazmente enfermedades asociadas con células que expresan CLDN18.2, incluyendo enfermedades cancerosas tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de vesícula biliar y metástasis de los mismos, en particular metástasis de cáncer gástrico tal como los tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos. Las enfermedades cancerosas particularmente preferidas son los adenocarcinomas del estómago, del esófago, del conducto pancreático, de los conductos biliares, del pulmón y del ovario.

30 En un aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 en combinación con un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2. La expresión de CLDN18.2 está preferentemente en la superficie celular de una célula cancerosa. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 se puede administrar antes, simultáneamente o después de la administración del anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2, o una combinación de los mismos.

35 El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede ser un agente citotóxico y/o citostático. En una realización, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un agente que induce una detención del ciclo celular o una acumulación de células en una o más fases del ciclo celular, preferiblemente en una o más fases del ciclo celular distintas de la fase G1. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en antraciclinas, compuestos de platino, análogos de nucleósidos, taxanos y análogos de camptotecina, o profármacos de los mismos, y combinaciones de los mismos. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en epirubicina, oxaliplatino, cisplatino, 5-fluorouracilo o sus profármacos tales como capecitabina, docetaxel, irinotecano y combinaciones de los mismos. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede comprender una combinación de oxaliplatino y 5-fluorouracilo o sus profármacos, una combinación de cisplatino y 5-fluorouracilo o sus profármacos, una combinación de al menos una antraciclina y oxaliplatino, una combinación de al menos un taxano y cisplatino, una combinación de al menos un taxano y cisplatino, una combinación de al menos un taxano y 5-fluorouracilo o profármacos de los mismos, o una combinación de al menos un análogo de camptotecina y 5-fluorouracilo o profármacos de los mismos. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede ser un agente que induce la muerte celular inmunogénica. El agente que induce la muerte celular inmunogénica puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en antraciclinas, oxaliplatino y combinaciones de los mismos. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede comprender una combinación de epirubicina y oxaliplatino. En una realización, el método de la invención comprende administrar al menos una antraciclina, al menos un compuesto de platino y al menos uno de 5-fluorouracilo y sus profármacos. La antraciclina se puede seleccionar del grupo que consiste en epirubicina, doxorubicina, daunorrubicina, idarrubicina y valrubicina. Preferiblemente, la antraciclina es epirubicina. El compuesto de platino puede seleccionarse del grupo que consiste en

5 oxaliplatino y cisplatino. El análogo de nucleósido puede seleccionarse del grupo que consiste en 5-fluorouracilo y sus profármacos. El taxano se puede seleccionar del grupo que consiste en docetaxel y paclitaxel. El análogo de camptotecina puede seleccionarse del grupo que consiste en irinotecano y topotecano. En una realización, el método de la invención comprende administrar (i) epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo, (ii) epirrubicina, oxaliplatino y capecitabina, (iii) epirrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo, (iv) epirrubicina, cisplatino y capecitabina, o (v) ácido fólico, oxaliplatino y 5-fluorouracilo.

10 En una realización, el método descrito en la presente memoria comprende además administrar un agente estimulante de células T $\gamma\delta$. En una realización, las células T $\gamma\delta$ son células T V γ 9V δ 2. En una realización, el agente estimulante de las células T $\gamma\delta$ es un bisfosfonato tal como un bisfosfonato que contiene nitrógeno (aminobisfosfonato). En una realización, el agente estimulante de las células T $\gamma\delta$ se selecciona del grupo que consiste en ácido zoledrónico, ácido clodrónico, ácido ibandrónico, ácido pamidrónico, ácido risedrónico, ácido minodrónico, ácido olpadrónico, ácido alendrónico, ácido incadrónico y sales de los mismos. En una realización, el agente estimulante de las células T $\gamma\delta$ se administra en combinación con interleuquina 2.

15 El método que se describe en la presente invención puede comprender además la administración de al menos un agente quimioterapéutico adicional que puede ser un agente citotóxico.

20 El anticuerpo que tiene la capacidad de unión a CLDN18.2 puede unirse a epítomos nativos de CLDN18.2 presentes en la superficie de células vivas. En una realización, el anticuerpo que tiene la capacidad de unión a CLDN18.2 se une al primer bucle extracelular de CLDN18.2. En una realización, el anticuerpo que tiene la capacidad de unión a CLDN18.2 media la muerte celular mediante uno o más de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación. En una realización, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo. En una realización, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en (i) un anticuerpo producido por y/o obtenible a partir de un clon depositado bajo el acceso no. DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 o DSM ACC2810, (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo bajo (i), (iii) un anticuerpo que tiene la especificidad del anticuerpo bajo (i) y (iv) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, del anticuerpo bajo (i) y que tiene preferiblemente la especificidad del anticuerpo bajo (i). En una realización, el anticuerpo se acopla a un agente terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.

30 En una realización, el método de la invención comprende administrar el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 a una dosis de hasta 1.000 mg/m². En una realización, el método de la invención comprende administrar el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 repetidamente a una dosis de 300 a 600 mg/m².

35 En una realización, el cáncer es positivo para CLDN18.2. En una realización, la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la vesícula biliar y sus metástasis. La enfermedad cancerosa puede ser un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos. En una realización, el cáncer es un adenocarcinoma, en particular un adenocarcinoma avanzado. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer del estómago, cáncer del esófago, en particular el esófago inferior, cáncer de la unión eso-gástrica y cáncer gastroesofágico. El paciente puede ser un paciente negativo para HER2/neu o un paciente con estado positivo para HER2/neu, pero no elegible para la terapia con trastuzumab.

40 De acuerdo con la invención, CLDN18.2 tiene preferiblemente la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

45 En un aspecto adicional, la presente enseñanza proporciona una preparación médica que comprende un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2. La preparación médica de la presente enseñanza puede comprender además un agente que estimula las células T $\gamma\delta$. El anticuerpo que tiene la capacidad de unión a CLDN18.2 y el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, y opcionalmente el agente que estimula células T $\gamma\delta$, puede estar presente en la preparación médica en una mezcla o separado de los demás. La preparación médica puede ser un kit que comprende un primer recipiente que incluye el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 y un recipiente que incluye el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y opcionalmente un recipiente que incluye el agente que estimula las células T $\gamma\delta$. La preparación médica puede incluir además instrucciones impresas para uso de la preparación para el tratamiento del cáncer, en particular para el uso de la preparación en un método de la invención. Diferentes realizaciones de la preparación médica y, en particular, del agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente que estimula células T $\gamma\delta$ son como se describió anteriormente para el método de la enseñanza.

55 La presente enseñanza también proporciona los agentes descritos en la presente memoria, tales como el anticuerpo

que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 para uso en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, para administración en combinación con un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, y opcionalmente un agente que estimula las células T γδ.

5 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1. Efecto de la quimioterapia en las células de cáncer gástrico. El cultivo de células Katolll durante 96 horas conduce a una detención del ciclo celular en la fase G0/G1 y la subregulación de CLDN18.2. Los compuestos citostáticos que resultan en una detención del ciclo celular en diferentes fases del ciclo celular (fase S (5-FU) o fase G2 (epirrubicina)) estabilizan la expresión de CLDN18.2.

Figura 2. Efecto de la quimioterapia en las células de cáncer gástrico. a/b: Efecto de la quimioterapia en los niveles de transcritos y de proteína de CLDN18.2 en células de cáncer gástrico. c: Citometría de flujo de IMAB362 extracelular que se une a células de cáncer gástrico tratadas con agentes quimioterapéuticos.

15 Figura 3. Efecto de la quimioterapia en las células de cáncer gástrico. Compuestos citostáticos que resultan en una detención del ciclo celular en diferentes fases del ciclo celular (fase S/G2 (irinotecano) o fase G2 (docetaxel)).

Figura 4. ADCC inducida por IMAB362 medió la muerte de células de cáncer gástrico después del pretratamiento con agentes quimioterapéuticos.

20 Figura 5. Efecto de la quimioterapia en las células de cáncer gástrico. a: Las células tratadas con irinotecano, docetaxel o cisplatino exhiben un nivel inferior de células viables en comparación con las células objetivo cultivadas en medio. b: La expresión de CLDN18.2 en células tratadas con irinotecano, docetaxel o cisplatino aumenta con respecto a las células cultivadas en medio. c/d: El tratamiento de las células con irinotecano, docetaxel o cisplatino aumenta la potencia de IMAB362 para inducir ADCC.

Figura 6. Efectos de la quimioterapia sobre CDC inducida por IMAB362.

Figura 7. Efectos de la quimioterapia sobre células efectoras.

25 Figura 8. Expansión de PBMC en cultivos complementados con ZA/IL-2.

Figura 9. Enriquecimiento de células T Vγ9Vδ2 en cultivos de PBMC complementados con ZA/IL-2.

Figura 10. Enriquecimiento de células T Vγ9Vδ2 en medio complementado con ZA y una dosis creciente de IL-2.

Figura 11. Expansión y actividad citotóxica de las células T Vγ9Vδ2 tras la incubación conjunta con monocitos pulsados con ZA y células cancerosas humanas.

30 Figura 12. Desarrollo dependiente de ZA de diferentes tipos de células en cultivos de PBMC.

Figura 13. Visualización de marcadores de superficie en células T Vγ9Vδ2 después del tratamiento con ZA/IL-2.

Figura 14. actividad ADCC de células T Vγ9Vδ2 con IMAB362 sobre células de cáncer gástrico NUGC-4 positivas para CLDN18.2.

Figura 15. ADCC de IMAB362 usando células T Vγ9Vδ2 como células efectoras.

35 Figura 16. Efectos de ZA en la localización superficial de CLDN18.2 en células objetivo.

Figura 17. Efectos de la quimioterapia y el tratamiento con ZA/IL-2 en células efectoras.

Figura 18. Estudios de biodistribución con anticuerpos conjugados en ratones.

Figura 19. Tratamiento temprano de xenoinjertos de tumor HEK293~CLDN18.2.

Figura 20. Tratamiento de xenoinjertos de tumor HEK293~CLDN18.2 avanzado.

Figura 21. Efecto de IMAB362 sobre el crecimiento tumoral subcutáneo de xenoinjertos de cáncer gástrico.

Figura 22. Efectos de la inmunoterapia con IMAB362 sobre xenoinjertos de carcinoma gástrico NCI-N87~CLDN18.2.

Figura 23. Efectos de terapia de combinación con IMAB362 y régimen de EOF sobre xenoinjertos NCI-N87~CLDN18.2.

Figura 24. Efectos de terapia de combinación con IMAB362 y régimen de EOF sobre xenoinjertos NUGC-4~CLDN18.2.

5 Figura 25. El efecto ZA/IL-2 indujo células T V γ 9V δ 2 sobre el control de tumores macroscópicos mediante IMAB362 en ratones NSG.

Figura 26. Efectos de terapia de combinación con IMAB362 y régimen de EOF sobre tumores de aloinjerto CLS-103~cldn18.2.

Descripción detallada de la invención

10 Aunque la presente enseñanza se describe en detalle más adelante, debe entenderse que esta enseñanza no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos aquí, ya que pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente enseñanza que estará limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria
15 tienen los mismos significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente enseñanza. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos descritos de forma diferente y las realizaciones preferidas no deben ser interpretados para limitar la presente enseñanza a solamente las realizaciones descritas en forma explícita.
20 Esta descripción debe entenderse como soporte y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas en forma explícita con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

25 Preferiblemente, los términos usados en la presente memoria se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en este campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Edición, J. Sambrook et al., Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).
30

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, la palabra "comprende", y variaciones tales como "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un miembro establecido, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones tal otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas pueden ser excluidos, es decir, el objeto consiste en la inclusión de un elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas establecidos. Los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y referencia similar utilizada en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben ser interpretados para abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o claramente sea contradicho por el contexto. La mención de los intervalos de valores en la presente memoria solamente pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si fuera mencionado individualmente en la presente memoria. Todos los métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que de otro modo se contradiga claramente con el contexto. El uso de cualquiera y de todos y cada uno de los ejemplos, o un ejemplo de expresión (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en la presente memoria, sólo pretende ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicando cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.
40
45

50 El término "CLDN18" se refiere a claudina 18 e incluye cualquier variante, incluyendo la variante 1 de empalme de claudina 18 (claudina 18.1 (CLDN18.1)) y la variante 2 de empalme de claudina 18 (claudina 18.2 (CLDN18.2)).

El término "CLDN18.2" preferiblemente se refiere a CLDN18.2 humana y, en particular, a una proteína que comprende, preferiblemente, que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

5 El término "CLDN18.1" se refiere preferiblemente a CLDN18.1 humano y, en particular, a una proteína que comprende, que consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

10 El término "variante" de acuerdo con la invención se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes en forma natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuyo significado a menudo no está claro. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de una especie es una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos con una especie de origen diferente de aquella de una secuencia dada de ácidos nucleicos o aminoácidos. El término "variante" abarcará cualquier variante modificada postraduccionalmente y variantes de conformación.

15 De acuerdo con la enseñanza, el término "cáncer positivo para CLDN18.2" significa un cáncer que implica células cancerosas que expresan CLDN18.2, preferiblemente sobre la superficie de dichas células cancerosas.

"Superficie celular" se utiliza de acuerdo con su significado normal en la técnica, e incluye así el exterior de la célula que es accesible a la unión mediante proteínas y otras moléculas.

CLDN18.2 se expresa en la superficie de las células si está situado en la superficie de dichas células y es accesible para unirse mediante anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a las células.

20 De acuerdo con la enseñanza, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión es menor comparado con la expresión en células estomacales o tejido estomacal. Preferiblemente, el nivel de expresión es inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5%, al 3%, al 2%, al 1%, al 0,5%, al 0,1% o al 0,05% de la expresión en células estomacales o tejido estomacal o incluso inferior. Preferiblemente, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto del estómago, pero no más de 2 veces, preferiblemente 1,5 veces, y preferiblemente no excede el nivel de expresión en dicho tejido no canceroso. Preferiblemente, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a las células.

30 De acuerdo con la enseñanza, CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto del estómago preferiblemente por más de 2 veces, preferiblemente 10 veces, 100 veces, 1.000 veces o 10.000 veces. Preferiblemente, CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a las células. Preferiblemente, CLDN18.2 expresado en una célula se expresa o se expone en la superficie de dicha célula.

35 De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo el cáncer, en particular las formas de cáncer descritas en la presente memoria. Cualquier referencia en el presente documento a cáncer o formas particulares de cáncer también incluye metástasis de cáncer del mismo. En una realización preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud implica células que expresan CLDN18.2.

40 "Enfermedades asociadas con células que expresan CLDN18.2" o expresiones similares significan según la invención que CLDN18.2 se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. En una realización, la expresión de CLDN18.2 en células de un tejido u órgano enfermo se incrementa en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50%, al menos el 100%, al menos el 200%, al menos el 500%, al menos el 1.000%, al menos el 10.000% o incluso más. En una realización, la expresión sólo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades asociadas con células que expresan CLDN18.2 incluyen enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades cancerosas son preferiblemente aquellas en las que las células cancerígenas expresan CLDN18.2.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, una "enfermedad cancerosa" o "cáncer" incluye una enfermedad caracterizada por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celular aberrantemente regulada. Por "célula cancerosa" se entiende una célula anormal que crece por una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesaron los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Preferiblemente, una "enfermedad cancerosa" se caracteriza por células que expresan CLDN18.2 y una célula cancerosa expresa CLDN18.2. Una célula que expresa CLDN18.2 preferiblemente es una célula cancerosa, preferiblemente de los cánceres descritos en la presente memoria.

"Adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido también es parte de una categoría de tejido más grande conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye piel, glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente de ectodermo, endodermo y mesodermo. Para ser clasificadas como adenocarcinoma, las células no necesariamente tienen que ser parte de una glándula, siempre y cuando tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede ocurrir en algunos mamíferos superiores, incluyendo humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que se derivan, aunque no lo son. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza omnipresente de las glándulas dentro del cuerpo. Aunque que cada glándula puede no secretar la misma sustancia, mientras exista una función exocrina a la célula, se considera glandular y su forma maligna se denomina adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y a menudo hacen metástasis dando el tiempo suficiente para ello. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometriode.

Por "metástasis" se entiende la diseminación de células cancerosas desde su sitio de origen a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende de la separación de las células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para entrar en la cavidad corporal y los vasos y luego, después de ser transportado por la sangre, infiltración de órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende del angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células tumorales o componentes pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema regional de ganglios linfáticos. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a metástasis de ganglios linfáticos. Una forma particular de metástasis que es tratable usando la terapia de la invención es la metástasis que se origina a partir del cáncer gástrico como sitio primario. En realizaciones preferidas tales metástasis de cáncer gástrico son tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos.

El tumor de Krukenberg es un tumor metastásico poco frecuente del ovario que representa del 1% al 2% de todos los tumores ováricos. El pronóstico del tumor de Krukenberg sigue siendo muy pobre y no existe un tratamiento establecido para los tumores de Krukenberg. El tumor de Krukenberg es un adenocarcinoma de anillo celular metastásico del ovario. El estómago es el sitio primario en la mayoría de los casos de tumores de Krukenberg (70%). Los carcinomas de colon, apéndice y mama (principalmente carcinoma lobular invasivo) son los siguientes sitios primarios más comunes. Se han descrito casos raros de tumor de Krukenberg originado de carcinomas de vesícula biliar, tracto biliar, páncreas, intestino delgado, ampolla de Vater, cuello uterino y vejiga urinaria/uraco. El intervalo entre el diagnóstico de un carcinoma primario y el posterior descubrimiento de la afección ovárica suele ser de 6 meses o menos, pero se han reportado períodos más prolongados. En muchos casos, el tumor primario es muy pequeño y puede escapar a la detección. La historia de un carcinoma anterior del estómago u otro órgano se puede obtener en sólo 20% a 30% de los casos.

El tumor de Krukenberg es un ejemplo de la diseminación selectiva de cánceres, más comúnmente en el eje estomago-ovario. Este eje de diseminación tumoral ha atraído históricamente la atención de muchos patólogos, especialmente cuando se encontró que las neoplasias gástricas hacen metástasis selectivamente a los ovarios sin la participación de otros tejidos. La ruta de la metástasis del carcinoma gástrico a los ovarios ha sido un misterio durante mucho tiempo, pero ahora es evidente que la propagación linfática retrógrada es la vía más probable de metástasis.

Las mujeres con tumores de Krukenberg tienden a ser inusualmente jóvenes para pacientes con carcinoma metastásico, ya que son típicamente en la quinta década de sus vidas, con una edad media de 45 años. Esta edad temprana de distribución puede estar relacionada en parte con el aumento de la frecuencia de los carcinomas de anillo celular gástrico en mujeres jóvenes. Los síntomas comunes de presentación suelen estar relacionados con la afección ovárica, los más comunes son dolor abdominal y distensión (principalmente debido a las masas ováricas usualmente bilaterales y a menudo grandes). Los pacientes restantes tienen síntomas gastrointestinales no específicos o son asintomáticos. Además, el tumor de Krukenberg está asociado con la virilización resultante de la producción de hormonas por estroma ovárico. La ascitis está presente en el 50% de los casos y generalmente revela células malignas.

Los tumores de Krukenberg son bilaterales en más del 80% de los casos reportados. Los ovarios suelen ser asimétricamente agrandados, con un contorno abultado. Las superficies seccionadas son de color amarillo o blanco; suelen ser sólidos, aunque ocasionalmente sean quísticos. Es importante destacar que la superficie capsular de los ovarios con tumores de Krukenberg es típicamente lisa y libre de adherencias o depósitos peritoneales. Es de notar que otros tumores metastásicos del ovario tienden a asociarse con implantes de superficie. Esto puede explicar por qué la morfología macroscópica del tumor de Krukenberg puede aparecer engañosamente como un tumor ovárico primario. Sin embargo, el bilateralismo en el tumor de Krukenberg es consistente con su naturaleza metastásica.

Los pacientes con tumores de Krukenberg tienen una tasa de mortalidad global que es significativamente alta. La mayoría de los pacientes mueren dentro de los 2 años (supervivencia media, 14 meses). Varios estudios muestran que el pronóstico es pobre cuando se identifica el tumor primario después de que se descubre la metástasis al ovario y el pronóstico empeora si el tumor primario permanece encubierto.

No se ha establecido claramente en la literatura ninguna estrategia de tratamiento óptima para los tumores de Krukenberg. No se ha abordado adecuadamente si se debe realizar una resección quirúrgica. La quimioterapia o la radioterapia no tienen un efecto significativo en el pronóstico de los pacientes con tumores de Krukenberg.

5 Por "tratamiento" se entiende administrar un compuesto o composición o una combinación de compuestos o composiciones a un sujeto con el fin de prevenir o eliminar una enfermedad, incluyendo la reducción del tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retardar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retardar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la esperanza vida del sujeto.

10 En particular, el término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o empeoramiento, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

15 El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un sujeto para tratamiento, en particular un sujeto enfermo, incluyendo seres humanos, primates no humanos u otros animales, en particular mamíferos tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores tales como ratones y ratas. En una realización particularmente preferida, un paciente es un ser humano.

20 El término "agente estabilizador o aumento de la expresión de CLDN18.2" se refiere a un agente o una combinación de agentes cuya provisión a las células da lugar a niveles incrementados de ARN y/o proteína de CLDN18.2, preferiblemente en niveles aumentados de proteína CLDN18.2 en la superficie celular, en comparación con la situación en la que no se proporcionan a las células el agente o la combinación de agentes. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, en particular una célula cancerosa que expresa CLDN18.2, tal como una célula de los tipos de cáncer descritos en el presente documento. El término "agente estabilizador o aumento de la expresión de CLDN18.2" se refiere, en particular, a un agente o una combinación de agentes cuya provisión a las células da lugar a una mayor densidad de CLDN18.2 sobre la superficie de dichas células en comparación con la situación en la que no se proporciona a las células el agente o la combinación de agentes. "Estabilización de la expresión de CLDN18.2" incluye, en particular, la situación en la que el agente o la combinación de agentes impide una disminución o reduce la disminución de la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 disminuiría sin la provisión del agente o la combinación de agentes y la provisión del agente o la combinación de agentes previene dicha disminución o reduce dicha disminución de la expresión de CLDN18.2. El "aumento de la expresión de CLDN18.2" incluye, en particular, la situación en la que el agente o la combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 disminuiría, permanecería esencialmente constante o aumentaría sin provisión del agente o la combinación de agentes y la provisión del agente o la combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18.2 en comparación con la situación sin la provisión del agente o la combinación de agentes, de manera que la expresión resultante es más alta en comparación con la situación en la que la expresión de CLDN18.2 disminuiría, permanecería esencialmente constante o aumentaría sin la provisión del agente o la combinación de agentes.

35 El término "agente estabilizador o aumento de la expresión de CLDN18.2" incluye agentes quimioterapéuticos o combinaciones de agentes quimioterapéuticos tales como agentes citostáticos. Los agentes quimioterapéuticos pueden afectar a las células de una de las siguientes maneras: (1) Dañar el ADN de las células para que ya no puedan reproducirse, (2) Inhibir la síntesis de nuevas cadenas de ADN para que no sea posible la replicación celular, (3) Detener los procesos mitóticos de las células para que las células no se pueden dividir en dos células.

40 El término "agente estabilizador o aumento de la expresión de CLDN18.2" se refiere preferiblemente a un agente o una combinación de agentes tales como un compuesto citostático o una combinación de compuestos citostáticos cuya provisión a las células, en particular a las células cancerosas, da lugar a que las células que se detienen en o que se acumulan en una o más fases del ciclo celular, preferiblemente en una o más fases del ciclo celular diferente de las fases G1 y G0, preferiblemente diferentes de la fase G1, preferiblemente en una o más de las fases G2 o S del ciclo celular tal como la fase G1/G2, S/G2, G2 o S del ciclo celular. El término "células que se detienen en o que se acumulan en una o más fases del ciclo celular" significa que el porcentaje de células que están en dichas una o más fases del ciclo celular aumenta. Cada célula pasa por un ciclo que comprende cuatro fases para replicarse. La primera fase llamada G1 es cuando la célula se prepara para replicar sus cromosomas. La segunda etapa se llama S, y en esta fase se produce la síntesis de ADN y se duplica el ADN. La fase siguiente es la fase G2, cuando el ARN y la proteína se duplican. La etapa final es la etapa M, que es la etapa de la división celular real. En esta etapa final, el ADN y el ARN duplicados se dividen y se mueven a extremos separados de la célula, y la célula realmente se divide en dos células funcionales idénticas. Los agentes quimioterapéuticos que son agentes dañinos del ADN generalmente dan como resultado una acumulación de células en la fase G1 y/o G2. Los agentes quimioterapéuticos que bloquean el crecimiento celular interfiriendo con la síntesis de ADN, tales como los antimetabolitos, generalmente dan como resultado una acumulación de células en la fase S. Ejemplos de estos fármacos son 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo.

El término "agente estabilizador o aumento de la expresión de CLDN18.2" incluye antraciclinas tales como epirrubina, compuestos de platino tales como oxaliplatino y cisplatino, análogos de nucleósidos tales como 5-fluorouracilo o profármacos de los mismos, taxanos tales como docetaxel y análogos de camptotecina tales como irinotecano y

topotecano y combinaciones de fármacos tales como combinaciones de fármacos que comprenden una o más antraciclinas tales como epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo, tal como una combinación de fármacos que comprenden oxaliplatino y 5-fluorouracilo u otras combinaciones de fármacos descritas en la presente memoria.

5 En una realización preferida, un "agente estabilizador o que aumenta la expresión de CLDN18.2 es un" agente que induce la muerte celular inmunogénica.

10 En circunstancias específicas, las células cancerosas pueden entrar en una vía letal de estrés ligada a la emisión de una combinación definida en una forma espaciotemporal de señales que es decodificada por el sistema inmune para activar respuestas inmunitarias específicas de tumores (Zitvogel L. et al., (2010) Cell 140: 798-804). En este escenario, las células cancerosas se activan para emitir señales que son detectadas por los efectores inmunes innatos tales como las células dendríticas para desencadenar una respuesta inmune afín que involucra células T CD8+ y señalización IFN-γ para que la muerte de las células tumorales pueda provocar una respuesta inmune anticancerígena productiva. Estas señales incluyen la exposición preapoptótica del retículo endoplasmático (ER) calreticulina chaperona (CRT) en la superficie celular, la secreción preapoptótica de ATP y la liberación postapoptótica de la proteína nuclear HMGB1. En conjunto, estos procesos constituyen los determinantes moleculares de la muerte celular inmunogénica (ICD). Las antraciclinas, oxaliplatino, y la irradiación y son capaces de inducir todas las señales que definen ICD, mientras que el cisplatino, por ejemplo, que es deficiente en la inducción de la translocación de CRT desde el ER a la superficie de las células que mueren-un proceso que requiere estrés del ER- requiere complementación por taspargina, un inductor de esfuerzo del ER.

20 El término "agente que induce la muerte celular inmunogénica" se refiere a un agente o una combinación de agentes que cuando se proporciona a las células, en particular a las células cancerosas, es capaz de inducir a las células a entrar en una vía letal de estrés, que finalmente resulta en respuestas inmunitarias específicas del tumor. En particular, un agente inductor de muerte celular inmunogénica cuando se proporcionan a las células induce las células para emitir una combinación definida en forma espaciotemporal de señales, incluyendo, en particular, la exposición preapoptótica del retículo endoplasmático (ER) calreticulina chaperona (CRT) en la superficie de la célula, la secreción preapoptótica de ATP, y la liberación postapoptótica de la proteína nuclear HMGB1.

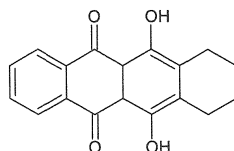
25 El término "agente que induce la muerte celular inmunogénica" incluye antraciclinas y oxaliplatino.

Las antraciclinas son una clase de fármacos comúnmente utilizados en la quimioterapia del cáncer que también son antibióticos. Estructuralmente, todas las antraciclinas comparten una estructura común de cuatro anillos 7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-quinona y normalmente requieren glicosilación en sitios específicos.

30 Preferiblemente, las antraciclinas producen uno o más de los siguientes mecanismos de acción: 1. Inhibir la síntesis de ADN y ARN mediante intercalación entre los pares de bases de la cadena de ADN/ARN, evitando así la replicación de células de cáncer de rápido crecimiento. 2. Inhibir la enzima topoisomerasa II, impidiendo la relajación del ADN superenrollado y bloqueando así la transcripción y replicación del ADN. 3. Creación de radicales libres de oxígeno mediada por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares.

35 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "antraciclina" se refiere preferiblemente a un agente, preferiblemente un agente anticanceroso para inducir la apoptosis, preferiblemente inhibiendo la reconexión del ADN en la topoisomerasa II.

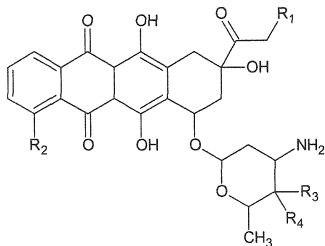
Preferiblemente, de acuerdo con la enseñanza, el término "antraciclina" se refiere generalmente a una clase de compuestos que tienen la siguiente estructura de anillo



40 incluyendo análogos y derivados, sales farmacéuticas, hidratos, ésteres, conjugados y profármacos de los mismos.

45 Los ejemplos de antraciclinas y análogos de antraciclina incluyen, pero no se limitan a, daunorrubicina (daunomicina), doxorrubicina (adriamicina), epirrubicina, idarrubicina, rodomicina, pirarrubicina, valrubicina, doxorrubicina-14-valerato de N-trifluoroacetilo, aclacinomicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorrubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolino-doxorrubicina (2-PDOX), 5-iminodaunomicina, mitoxantrona y aclacinomicina A (aclarrubicina). La mitoxantrona es un miembro de la clase de compuestos de antracendiona, que son análogos de antraciclina que carecen de la fracción de azúcar de las antraciclinas pero que retienen la estructura de anillo aromático policíclico plano que permite la intercalación en el ADN.

Particularmente preferida como antraciclina de acuerdo con la invención es un compuesto de la siguiente fórmula:

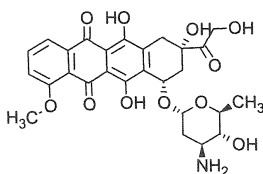


en donde

- 5 R_1 se selecciona del grupo que consiste en H y OH, R_2 se selecciona del grupo que consiste en H y OMe, R_3 se selecciona del grupo que consiste en H y OH y R_4 se selecciona del grupo que consiste en H y OH.

En una realización, R_1 es H, R_2 es OMe, R_3 es H y R_4 es OH. En otra realización, R_1 es OH, R_2 es OMe, R_3 es H y R_4 es OH. En otra realización, R_1 es OH, R_2 es OMe, R_3 es OH y R_4 es H. En otra realización, R_1 es H, R_2 es H, R_3 es H y R_4 es OH.

- 10 Específicamente contemplada como antraciclina en el contexto de la presente invención está la epirrubicina. La epirrubicina es un fármaco de antraciclina que tiene la siguiente fórmula:



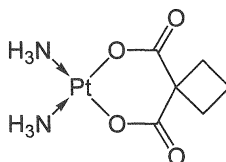
- 15 y se comercializa bajo el nombre comercial Ellence en los EE.UU. y como Pharmorubicin o Epirubicin Ebewe en otros lugares. En particular, el término "epirrubicina" se refiere al compuesto (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metil-oxan-2-il]oxi-6,11-dihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-8-metil-9,10-dihidro-7H-tetracen-5,12-diona. Se prefiere la epirrubicina sobre la doxorubicina, la antraciclina más popular, en algunos regímenes de quimioterapia, ya que parece causar menos efectos secundarios.

De acuerdo con la enseñanza, el término "compuesto de platino" se refiere a compuestos que contienen platino en su estructura tales como complejos de platino e incluye compuestos tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

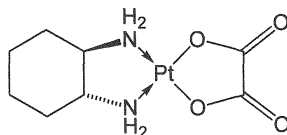
El término "cisplatino" se refiere al compuesto cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) de la siguiente fórmula:



El término "carboplatino" se refiere al compuesto cis-diamina (1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) de la siguiente fórmula:



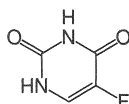
- 25 El término "oxaliplatino" se refiere a un compuesto que es un compuesto de platino que está complejoado con un ligando portador de diaminociclohexano de la siguiente fórmula:



En particular, el término oxaliplatino se refiere al compuesto [(1R, 2R) -ciclohexano-1,2-diamina] (etanodioato-O, O') platino (II). El oxaliplatino para inyección también se comercializa bajo el nombre comercial Eloxatine.

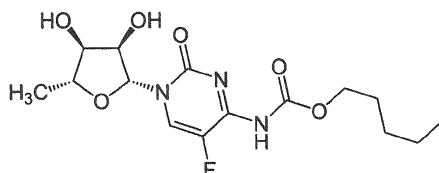
5 El término "análogo de nucleósido" se refiere a un análogo estructural de un nucleósido, una categoría que incluye tanto análogos de purina como análogos de pirimidina. En particular, el término "análogo de nucleósido" se refiere a derivados de fluoropirimidina que incluyen fluorouracilo y profármacos de los mismos.

El término "fluorouracilo" o "5-fluorouracilo" (5-FU o f5U) (vendido bajo las marcas Adrucil, Carac, Efudix, Efudex y Fluoroplex) es un compuesto que es un análogo de pirimidina de la siguiente fórmula:



En particular, el término se refiere al compuesto 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona.

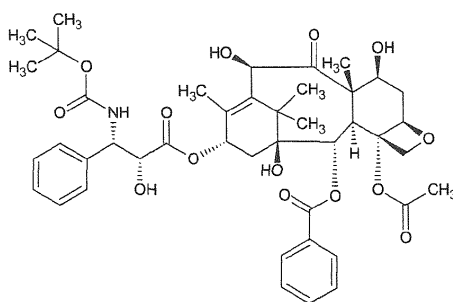
10 El término "capecitabina" (Xeloda, Roche) se refiere a un agente quimioterapéutico que es un profármaco que se convierte en 5-FU en los tejidos. La capecitabina que puede administrarse por vía oral tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término se refiere al compuesto [1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofuran-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbamato de pentilo.

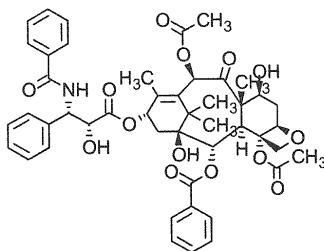
15 Los taxanos son una clase de compuestos diterpénicos que primero se derivaron de fuentes naturales tales como plantas del género Taxus, pero algunos se han sintetizado artificialmente. El principal mecanismo de acción de la clase taxano de fármacos es la interrupción de la función de los microtúbulos, inhibiendo así el proceso de división celular. Los taxanos incluyen docetaxel (Taxotere) y paclitaxel (Taxol).

De acuerdo con la enseñanza, el término "docetaxel" se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



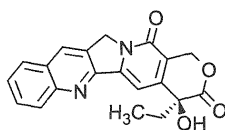
20

De acuerdo con la enseñanza, el término "paclitaxel" se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



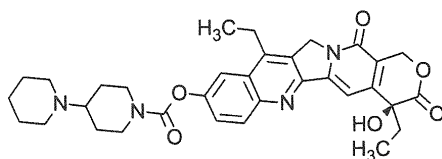
25

De acuerdo con la enseñanza, el término "análogo de camptotecina" se refiere a derivados del compuesto camptotecina (CPT; (S)-4-etil-4-hidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14-(4H,12H)-diona). Preferiblemente, el término "análogo de camptotecina" se refiere a compuestos que comprenden la siguiente estructura:



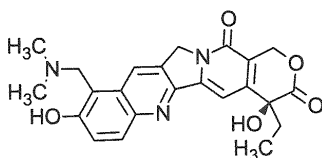
De acuerdo con la enseñanza, los análogos de camptotecina preferidos son inhibidores de la enzima ADN topoisomerasa I (topo I). Los análogos preferidos de camptotecina de acuerdo con la enseñanza son irinotecano y topotecano.

- 5 El irinotecano es un fármaco que evita el desenrollamiento del ADN por inhibición de la topoisomerasa I. En términos químicos, es un análogo semisintético del alcaloide natural camptotecina que tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término "irinotecano" se refiere al compuesto (S)-4,11-dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo-1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-9-il-[1,4'bipiperidin]-1'-carboxilato.

- 10 Topotecano es un inhibidor de topoisomerasa de la fórmula:



En particular, el término "topotecano" se refiere al compuesto monoclóhidrato de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14(4H, 12H)-diona.

- 15 De acuerdo con la presente enseñanza, un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede ser un agente quimioterapéutico, en particular un agente quimioterapéutico establecido en el tratamiento de cáncer y puede ser parte de una combinación de fármacos tales como una combinación de fármacos establecidos para uso en el tratamiento de cáncer. Dicha combinación de fármacos puede ser una combinación de fármacos usada en quimioterapia y puede ser una combinación de fármacos tal como se utiliza en un régimen quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en quimioterapia EOX, quimioterapia ECF, quimioterapia ECX, quimioterapia EOF, quimioterapia FLO, quimioterapia FOLFOX, quimioterapia FOLFIRI, quimioterapia DCF y quimioterapia FLOT.
- 20

La combinación de fármacos utilizada en quimioterapia EOX comprende epirrubicina, oxaliplatino y capecitabina. La combinación de fármacos utilizada en quimioterapia ECF comprende epirrubicina, cisplatino y 5-fluorouracilo. La combinación de fármacos utilizada en quimioterapia ECX comprende epirrubicina, cisplatino y capecitabina. La combinación de fármacos usada en quimioterapia EOF comprende epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo.

- 25 La epirrubicina se administra normalmente en una dosis de 50 mg/m², cisplatino 60 mg/m², oxaliplatino 130 mg/m², infusión venosa prolongada de 5-fluorouracilo a 200 mg/m²/día y capecitabina oral 625 mg/m² dos veces al día, para un total de ocho ciclos de 3 semanas.

- 30 La combinación de fármacos usada en quimioterapia FLO comprende 5-fluorouracilo, ácido fólico y oxaliplatino (normalmente 5-fluorouracilo 2.600 mg/m² de infusión durante 24 h, ácido fólico 200 mg/m² y oxaliplatino 85 mg/m², cada 2 semanas).

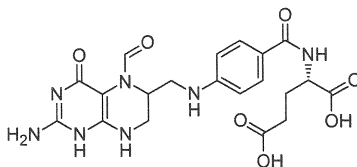
- 35 FOLFOX es un régimen de quimioterapia compuesto por ácido fólico (leucovorina), 5-fluorouracilo y oxaliplatino. El programa de dosis recomendado que se administra cada dos semanas es el siguiente: Día 1: oxaliplatino 85 mg/m² infusión iv y leucovorina 200 mg/m² infusión iv seguida por 5-FU 400 mg/m² bolo iv, seguido por 5-FU 600 mg/m² infusión iv como una infusión continua de 22 horas; Día 2: leucovorina 200 5-FU 600 mg/m² infusión iv durante 120 minutos, seguido por 5-FU 400 5-FU 600 mg/m² de bolo iv administrado durante 2 a 4 minutos, seguido por 5-FU 600 5-FU 600 mg/m² infusión iv como una infusión continua de 22 horas.

La combinación de fármacos usada en la quimioterapia FOLFIRI comprende 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecano.

La combinación de fármacos usada en la quimioterapia con DCF comprende docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo.

La combinación de fármacos usada en la quimioterapia FLOT comprende docetaxel, oxaliplatino, 5-fluorouracilo y ácido folínico.

5 El término "ácido folínico" o "leucovorina" se refiere a un compuesto útil en combinación sinérgica con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo. El ácido folínico tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término se refiere al compuesto ácido (2S)-2-[[4-[(2-amino-5-formil-4-oxo-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoyl]amino]pentanodioico.

10 Las células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor distinto de células T (TCR) sobre su superficie. La mayoría de células T tienen un TCR compuesto de dos cadenas de glicoproteínas denominadas cadenas α y β -TCR. Por el contrario, en las células T $\gamma\delta$, el TCR está constituido por una cadena γ y una cadena δ . Este grupo de células T suele ser mucho menos común que las células T $\alpha\beta$. Las células T $\gamma\delta$ humanas juegan un papel importante en las respuestas de vigilancia del estrés tal como las enfermedades infecciosas y autoinmunes. También se sugiere que los cambios inducidos por la transformación en los tumores causan respuestas de vigilancia del estrés mediadas por las células T $\gamma\delta$ y potencian la inmunidad antitumoral. Es importante destacar que después del acoplamiento con el antígeno, las células T $\gamma\delta$ activadas en los sitios de la lesión producen citoquinas (por ejemplo, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) y/o quimioquinas que median el reclutamiento de otras células efectoras y muestran funciones efectoras inmediatas tales como citotoxicidad (a través de las rutas del receptor de muerte y los gránulos citolíticos) y ADCC.

20 La mayoría de las células T $\gamma\delta$ en sangre periférica expresan al receptor de las células T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ (TCR $\gamma\delta$). Las células T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ son únicas para los seres humanos y los primates y se asume que desempeñan un papel temprano y esencial en la detección de "peligro" por la invasión de patógenos a medida que se expanden dramáticamente en muchas infecciones agudas y pueden exceder todos los otros linfocitos dentro de unos pocos días, por ejemplo, en tuberculosis, salmonelosis, ehrlichiosis, brucelosis, tularemia, listeriosis, toxoplasmosis y malaria.

25 Las células T $\gamma\delta$ responden a pequeños antígenos fosforilados no peptídicos (fosfoantígenos) tales como pirofosfatos sintetizados en bacterias y pirofosfato de isopentenilo (IPP) producidos en células de mamífero a través de la vía de mevalonato. Mientras que la producción de IPP en células normales no sea suficiente para la activación de células T $\gamma\delta$, la desregulación de la vía de mevalonato en células tumorales conduce a la acumulación de IPP y la activación de las células T $\gamma\delta$. Los IPP también pueden ser incrementados terapéuticamente por los aminobifosfonatos, que inhiben la enzima de la ruta del mevalonato, farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Entre otros, el ácido zoledrónico (ZA, zoledronato, Zometa^{MR}, Novartis) representa dicho aminobifosfonato, que ya se administra clínicamente a pacientes para el tratamiento de osteoporosis y enfermedad ósea metastásica. Tras el tratamiento de PBMC *in vitro*, ZA es absorbido especialmente por monocitos. El IPP se acumula en los monocitos y se diferencian en células presentadoras de antígeno que estimulan el desarrollo de células T $\gamma\delta$. En este contexto, se prefiere la adición de interleuquina 2 (IL-2) como factor de crecimiento y de supervivencia para las células T $\gamma\delta$ activadas. Finalmente, se han descrito ciertas aminos alquiladas para activar las células T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$ *in vitro*, sin embargo, sólo en concentraciones milimolares.

40 De acuerdo con la presente invención, el término "agente estimulador de células T $\gamma\delta$ " se refiere a compuestos que estimulan el desarrollo de células T $\gamma\delta$, en particular células T $\text{V}\gamma 9\text{V}\delta 2$, *in vitro* y/o *in vivo*, en particular por inducción de activación y expansión de células T $\gamma\delta$. Preferiblemente, el término se refiere a compuestos que *in vitro* y/o *in vivo* aumentan el pirofosfato de isopentenilo (IPP) producido en células de mamífero, preferiblemente mediante la inhibición de la enzima de la ruta del mevalonato, farnesil pirofosfato sintasa (FPPS).

Un grupo particular de compuestos que estimulan células T $\gamma\delta$ son bisfosfonatos, en particular los bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-bisfosfonatos, aminobisfosfonatos).

45 Por ejemplo, bisfosfonatos adecuados para uso en la invención pueden incluir uno o más de los siguientes compuestos incluyendo análogos y derivados, sales farmacéuticas, hidratos, ésteres, conjugados y profármacos de los mismos:

[1-hidroxi-2-(1H-imidazol-1-il)etano-1,1-diil]bis(ácido fosfónico), ácido zoledrónico, por ejemplo, zoledronato;

ácido (dicloro-fosfono-metil)fosfónico, por ejemplo, clodronato;

- {1-hidroxi-3- [metil (pentil)amino]propano-1,1-diil}bis(ácido fosfónico), ácido ibandrónico, por ejemplo, ibandronato
- (3-amino-1-hidroxiopropano-1,1-diil)bis(ácido fosfónico), ácido pamidrónico, por ejemplo, pamidronato;
- ácido (1-hidroxi-1-fosfono-2-piridin-3-il-etil)fosfónico, ácido risedrónico, por ejemplo, risedronato;
- ácido (1-hidroxi-2-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-1-fosfonoetil)fosfónico, ácido minodrónico;
- 5 [3-(dimetilamino)-1-hidroxiopropano-1,1-diil]bis(ácido fosfónico), ácido olupadrónico;
- ácido [4-amino-1-hidroxi-1-(hidroxi-oxido-fosforil)-butil]fosfónico, ácido alendrónico, por ejemplo, alendronato;
- [(cicloheptilamino)metilen]bis(ácido fosfónico), ácido incadrónico;
- (1-hidroxi-2-etil-1,1-diil)bis(ácido fosfónico), ácido etidrónico, por ejemplo, etidronato; y
- {[(4-clorofenil)tio]metilen}bis(ácido fosfónico), ácido tiludrónico.
- 10 De acuerdo con la enseñanza, el ácido zoledrónico (INN) o zoledronato (comercializado por Novartis bajo los nombres comerciales Zometa, Zomera, Aclasta y Reclast) es un bisfosfonato particularmente preferido. Zometa se utiliza para prevenir fracturas esqueléticas en pacientes con cánceres como mieloma múltiple y cáncer de próstata, así como para tratar la osteoporosis. También se puede utilizar para tratar la hipercalcemia de neoplasia y puede ser útil para tratar el dolor de las metástasis óseas.
- 15 En una realización particularmente preferida, se administra un agente que estimula células T $\gamma\delta$ de acuerdo con la invención en combinación con IL-2. Se ha demostrado que esta combinación es particularmente eficaz en la mediación de la expansión y activación de las células T $\gamma\delta$ 2.
- 20 La interleuquina 2 (IL-2) es una interleuquina, un tipo de molécula de señalización de citoquina en el sistema inmune. Es una proteína que atrae a los linfocitos y es parte de la respuesta natural del cuerpo a la infección microbiana, y en la discriminación entre el foráneo (no propio) y el propio. La IL-2 media sus efectos por unión a receptores de IL-2, los cuales son expresados por linfocitos.
- La IL-2 usada de acuerdo con la invención puede ser cualquier IL-2 que soporta o permite la estimulación de células T $\gamma\delta$ y puede derivarse de cualquier especie, preferiblemente humana. IL-2 puede ser aislado, producido de forma recombinante o IL-2 sintética y puede ser IL-2 de origen natural o modificada.
- 25 En una realización de la presente enseñanza, se administra la quimioterapia estándar de acuerdo con el régimen EOX en combinación con un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2, en particular IMAB362 para máximo 8 ciclos. Las dosis y los programas de dosificación pueden ser los siguientes:
- 50 mg/m² de epirrubicina se administrarán en forma iv como una infusión durante 15 minutos el día 1 de cada ciclo durante la fase EOX.
- 30
- 130 mg/m² de oxaliplatino se administrarán en forma iv como una infusión durante 2 h el día 1 de cada ciclo durante la fase EOX.
 - 625 mg/m² de capecitabina se toma por vía oral dos veces al día durante 21 días en la mañana y en la noche comenzando con la noche del día 1 de cada ciclo durante la fase EOX.
- 35
- 1.000 mg/m² de anticuerpo se administrarán en forma iv como una infusión durante 2 h el día 1 del ciclo 1. Posteriormente se administrarán 600 mg/m² de anticuerpo en forma iv como una infusión durante 2 h el día 1 de cada ciclo después de que se completa la infusión de oxaliplatino.
 - Después de la terminación de la quimioterapia, el paciente continuará con 600 mg/m² de anticuerpos como una infusión durante 2 h cada 3 o 4 semanas.
- 40 En una realización de la presente enseñanza, la quimioterapia estándar de acuerdo con el régimen EOX en combinación con ZA/IL-2 y un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2, en particular IMAB362 se administra durante hasta 8 ciclos (24 semanas).

El término "antígeno" se refiere a un agente tal como una proteína o péptido que comprende un epítipo contra el cual se

dirige y/o se va a dirigir una respuesta inmune. En una realización preferida, un antígeno es un antígeno asociado con un tumor, tal como CLDN18.2, es decir, un constituyente de células cancerosas que puede derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, en forma intracelular o como antígenos de superficie sobre células cancerosas.

5 En el contexto de la presente enseñanza, el término "antígeno asociado al tumor" se refiere preferiblemente a proteínas que son bajo condiciones normales específicamente expresadas en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas y se expresan o se expresan en forma aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerígenos. En el contexto de la presente enseñanza, el antígeno asociado al tumor está asociado preferiblemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferiblemente no se expresa o se expresa raramente en tejidos normales.

15 El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que es reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, que es reconocida por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítopos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmunológico. Los epítopos consisten usualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Un epítipo de una proteína tal como CLDN18.2 comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y está preferiblemente entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede ser preferiblemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

25 El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, e incluye cualquier molécula que comprende una porción de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de anticuerpos, incluyendo, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y de scFv, tales como fragmentos Fab y Fab' y también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento de anticuerpo de unión a antígenos y derivados como se describe en la presente memoria. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

40 Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos descritos en la presente memoria pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

45 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde la estructura de la inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede o bien comprender dominios variables completos fusionados sobre dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en las regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificadas para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados preservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que se alteran con respecto al anticuerpo original.

55 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácido de cadenas pesada y ligera es homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el resto del segmento de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en el otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas tanto ligera como pesada imitan las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las

porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivadas de la otra. Una ventaja clara de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones celulares humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por la fuente, siendo la región constante humana, es menos probable que provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando los anticuerpos se inyectan de lo que sería la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los términos "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten de los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten de los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten de un dominio VH; (vi) regiones aisladas determinantes de complementariedad (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite ser elaborados como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426 y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también están destinados a estar comprendidos dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra y (iii) una región constante CH₃ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH₂. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para la utilidad en la misma forma que los anticuerpos intactos.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido o un complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse a, o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido o un complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse a, o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas dirigidas a CLDN18.2 y a otros objetivos, tales como receptores Fc en células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con otros dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al., (1994) Structure 2: 1121-1123).

Un anticuerpo puede conjugarse con una fracción o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para, y en particular, mata células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracín diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En aún otra realización, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina,

sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los anticuerpos también pueden conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo 131, itrio 90 o indio 111, para generar radiofármacos citotóxicos.

5 Los conjugados de anticuerpo de la enseñanza pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria; una proteína tal como un factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

15 Las técnicas para conjugar tal fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al., (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al., (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

25 Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema mediante inmunización de un animal o mediante cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina, y en donde el anticuerpo seleccionado es al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de línea germinal particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, más preferiblemente, no más de 5, o incluso más preferiblemente, no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de línea germinal.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión al antígeno unidas entre sí, al menos dos de las cuales tienen especificidades diferentes. Estas especificidades diferentes incluyen una especificidad de unión para un receptor Fc en una célula efectora y una especificidad de unión para un antígeno o epítipo en una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

35 Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad y afinidad de unión. En una realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

40 Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden ser anticuerpos recombinantes. El término "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza aquí, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos combinatorios, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden derivarse de diferentes especies, incluyendo, pero sin limitarse a ratón, rata, conejo, cobaya y humano.

50 Los anticuerpos descritos en la presente invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen anticuerpos IgA tales como IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. En varias realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un anticuerpo un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda (es decir, IgG1, κ , λ), un anticuerpo IgG2a (por ejemplo, IgG2a, κ , λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo, IgG2b, κ , λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ , λ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo, IgG4, κ , λ).

El término "transfectoma", tal como se usa en la presente memoria, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células HEK293T, células

vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no está constituido por el organismo transgénico y que generalmente se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera de murino es un anticuerpo heterohíbrido.

La enseñanza incluye todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos como se describe en el presente documento, que para los propósitos de la enseñanza están abarcados por el término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento están preferiblemente aislados. Un "anticuerpo aislado" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN18.2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes a CLDN18.2). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN18.2 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de CLDN18.2). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que tienen diferentes especificidades y se combinan en una composición o mezcla bien definida.

El término "unión" de acuerdo con la enseñanza se refiere preferiblemente a una unión específica.

De acuerdo con la presente enseñanza, un anticuerpo es capaz de unirse a un objetivo predeterminado si tiene una afinidad significativa para dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" se mide a menudo mediante una constante de disociación de equilibrio (K_D). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un anticuerpo no es (sustancialmente) capaz de unirse a un objetivo si no tiene afinidad significativa por dicho objetivo y no se une significativamente, en particular no se une en forma detectable a dicho objetivo en ensayos estándar. Preferiblemente, el anticuerpo no se une de forma detectable a dicha objetivo si está presente en una concentración de hasta 2, preferiblemente 10, más preferiblemente 20, en particular 50 o 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o superior. Preferiblemente, un anticuerpo no tiene afinidad significativa por un objetivo si se une a dicho objetivo con un K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces o 10^6 veces superior que la K_D para unirse al objetivo predeterminado al que el anticuerpo es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para unión de un anticuerpo al objetivo al cual es capaz de unirse el anticuerpo es de 10^{-7} M, la K_D para unión a un objetivo para el cual el anticuerpo no tiene afinidad significativa sería de al menos de 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

Un anticuerpo es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado mientras que no sea capaz de unirse a otros objetivos, es decir, no tiene afinidad significativa por otros objetivos y no se une significativamente a otros objetivos en ensayos estándar. De acuerdo con la invención, un anticuerpo es específico para CLDN18.2 si es capaz de unirse a CLDN18.2 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos. Preferiblemente, un anticuerpo es específico para CLDN18.2 si la afinidad y la unión a estos otros objetivos no excede significativamente la afinidad para o unión con proteínas no relacionadas de CLDN18.2 tales como albúmina de suero bovino (BSA), caseína, albúmina de suero humano (HSA) o proteínas transmembrana diferentes a claudina tales como moléculas de MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferiblemente, un anticuerpo es específico para un objetivo predeterminado si se une a dicho objetivo con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces inferior a la K_D para que se una a un objetivo para el cual no es específico. Por ejemplo, si la K_D para unión de un anticuerpo al objetivo para el cual es específico es 10^{-7} M, la K_D para unión a un objetivo para el cual no es específico sería de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M o 10^{-1} M.

La unión de un anticuerpo a un objetivo se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, WE, Ed., Raven Press, New York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, WH Freeman and Company (1992), y los métodos descritos en la presente memoria. Las afinidades pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; mediante el uso del instrumento BIAcore 2000, utilizando procedimientos generales indicados por el fabricante; por radioinmunoensayo usando antígeno objetivo marcado en forma radioactiva; o mediante

otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un regulador estandarizado.

Tal como se usa en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "conmutación de isotipo" se refiere al fenómeno mediante el cual la clase o isotipo de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a otra de las otras clases de Ig.

El término "que ocurre naturalmente", tal como se usa aquí, aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, se produce naturalmente un polipéptido o secuencia polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificado por el hombre en el laboratorio.

El término "reordenado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o de cadena ligera en el que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento DJ o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Un locus del gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado puede identificarse por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

El término "no reordenada" o "configuración de línea germinal", como se usa en la presente memoria descriptiva en referencia a un segmento V, se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina de manera que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

De acuerdo con la enseñanza, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo presente en CLDN18.2, preferiblemente un epítipo localizado dentro de los dominios extracelulares de CLDN18.2, en particular el primer dominio extracelular, preferentemente las posiciones de aminoácidos 29 a 78 de CLDN18.2. En realizaciones particulares, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es un anticuerpo capaz de unirse a (i) un epítipo en CLDN18.2 que no está presente en CLDN18.1, preferiblemente las SEQ ID NO: 3, 4 y 5, (ii) un epítipo localizado en el bucle 1 de CLDN18.2, preferiblemente la SEQ ID NO: 8, (iii) un epítipo localizado en el bucle 2 de CLDN18.2, preferiblemente la SEQ ID NO: 10, (iv) un epítipo localizado en el bucle D3 de CLDN18.2, preferiblemente la SEQ ID NO: 11, (v) un epítipo, que abarca el bucle 1 de CLDN18.2 y un bucle D3 de CLDN18.2, o (vi) un epítipo no glicosilado localizado en el bucle D3 de CLDN18.2, preferiblemente la SEQ ID NO: 9.

De acuerdo con la enseñanza, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es preferiblemente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 pero no a CLDN18.1. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es específico para CLDN18.2. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es preferiblemente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 expresado en la superficie celular. En realizaciones particularmente preferidas, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a epítipos nativos de CLDN18.2 presentes en la superficie de células vivas. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46 y 48-50. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos antes mencionados o derivados de los mismos. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 puede obtenerse por un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 3-11, 44, 46 y 48-50, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido. Preferiblemente, el anticuerpo se une a células cancerosas, en particular células de los tipos de cáncer mencionados anteriormente y, preferiblemente, no se une substancialmente a células no cancerosas.

Preferiblemente, la unión de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 con células que expresan CLDN18.2 induce o media la muerte de células que expresan CLDN18.2. Las células que expresan CLDN18.2 son preferiblemente células cancerosas y son, en particular, seleccionadas del grupo constituido por células cancerígenas tumorigénicas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza-cuello y vesícula biliar. Preferiblemente, el anticuerpo induce o media la muerte de células induciendo una o más de la lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la apoptosis y la inhibición de la proliferación de células que expresan CLDN18.2. Preferiblemente, la lisis mediada por ADCC de células tiene lugar en presencia de células efectoras, las cuales en realizaciones particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN. La inhibición de la proliferación de células se puede medir in vitro determinando la proliferación de células en un ensayo

usando bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede ser incorporado en el ADN recién sintetizado de las células de replicación (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo por timidina durante la replicación del ADN. Detectar el producto químico incorporado utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos para BrdU indica células que estaban replicando activamente su ADN.

5 En realizaciones preferidas, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

a) especificidad por CLDN18.2;

b) una afinidad de unión a CLDN18.2 de aproximadamente 100 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 5-10 nM o menos y, más preferiblemente, de aproximadamente 1-3 nM o menos,

10 c) la capacidad para inducir o mediar CDC en células positivas para CLDN18.2;

c) la capacidad para inducir o mediar ADCC en células positivas para CLDN18.2;

e) la capacidad para inhibir el crecimiento de células positivas para CLDN18.2;

f) la capacidad para inducir la apoptosis de células positivas para CLDN18.2.

15 En una realización particularmente preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se produce mediante un hibridoma depositado en la DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Alemania, nueva dirección: Inhoffenstr.7B, 31824 Braunschweig, Alemania) y que tiene la siguiente designación y número de acceso:

a. 182-D1106-055, número de acceso DSM ACC2737, depositado el 19 de octubre de 2005

b. 182-D1106-056, número de acceso DSM ACC2738, depositado el 19 de octubre de 2005

c. 182-D1106-057, número de acceso DSM ACC2739, depositado el 19 de octubre de 2005

20 d. 182-D1106-058, número de acceso DSM ACC2740, depositado el 19 de octubre de 2005

e. 182-D1106-059, número de acceso DSM ACC2741, depositado el 19 de octubre de 2005

f. 182-D1106-062, número de acceso DSM ACC2742, depositado el 19 de octubre de 2005,

g. 182-D1106-067, número de acceso DSM ACC2743, depositado el 19 de octubre de 2005

h. 182-D758-035, número de acceso DSM ACC2745, depositado el 17 de noviembre de 2005

25 i. 182-D758-036, número de acceso DSM ACC2746, depositado el 17 de noviembre de 2005

j. 182-D758-040, número de acceso DSM ACC2747, depositado el 17 de noviembre de 2005

k. 182-D1106-061, número de acceso DSM ACC2748, depositado el 17 de noviembre de 2005

l. 182-D1106-279, número de acceso DSM ACC2808, depositado el 26 de octubre de 2006

m. 182-D1106-294, número de acceso DSM ACC2809, depositado el 26 de octubre de 2006,

30 n. 182-D1106-362, número de acceso. DSM ACC2810, depositado el 26 de octubre de 2006.

Los anticuerpos preferidos de acuerdo con la enseñanza son los producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente; es decir 37G11 en el caso de 182-D1106-055, 37H8 en el caso de 182-D1106-056, 38G5 en el caso de 182-D1106-057, 38H3 en el caso de 182-D1106-058, 39F11 en el caso de 182-D1106-059, 43A11 en el caso de 182-D1106-062, 61C2 en el caso de 182-D1106-067, 26B5 en el caso de 182-D758-035, 26D12 en el caso de 182-D758-036, 28D10 en el caso de 182-D758-040, 42E12 en el caso de 182-D1106-061, 125E1 en el caso de 182-D1106-279, 163E12 en el caso de 182-D1106-294 y 175D10 en el caso de 182-D1106-362; y sus formas quimerizada y humanizada.

35 Los anticuerpos quimerizados preferidos y sus secuencias se muestran en la siguiente tabla.

	clon	mAb	Isotipo	Región variable	Anticuerpo quimerizado
cadena pesada	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 14
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 15
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 16
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 18
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 17
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 19
cadena ligera	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 21
	163E12	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 20
	125E1	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 22
	166E2	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 25
	175D10	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 24
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 23
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 26
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 27
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 28

5 En las realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13 o un fragmento del mismo. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena ligera (CL) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena ligera humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma. En una realización particular preferida, los anticuerpos, en particular las formas quiméricas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CH humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma y que comprende una CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma.

10 En una realización, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es un anticuerpo monoclonal quimérico IgG1 de ratón/humano que comprende una cadena ligera variable murina kappa, un alotipo Km(3) de región constante de cadena ligera kappa humana, una región variable de cadena pesada murina, una región constante de IgG1 humana, alotipo G1m (3).

20 En ciertas realizaciones preferidas, las formas quimerizadas de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19 y un fragmento de la misma y/o que comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y un fragmento de la misma.

En ciertas realizaciones preferidas, las formas quimerizadas de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una combinación de cadenas pesadas y cadenas ligeras seleccionadas de entre las siguientes posibilidades (i) a (ix):

- 5 (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 o un fragmento de la misma,
- (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20 o un fragmento de la misma,
- 10 (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 o un fragmento de la misma,
- (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 o un fragmento de la misma,
- 15 (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24 o un fragmento de la misma,
- 20 (vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23 o un fragmento de la misma,
- (vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 o un fragmento de la misma,
- 25 (viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27 o un fragmento de la misma y
- (ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 o un fragmento de la misma.
- 30 "Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se ha utilizado anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpos acortada en el extremo terminal N y/o C, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a CLDN18.2 y preferiblemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente memoria, por ejemplo lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC. Preferiblemente, un fragmento de una
- 35 secuencia de aminoácidos comprende al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se refiere preferiblemente a dicha secuencia en la que se eliminan 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoácidos en el extremo terminal N.
- 40 En una realización preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29, 30, 31, 32, 33, 34, y un fragmento de la misma.
- En una realización preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en
- 45 las SEQ ID NOs: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, y un fragmento de la misma.
- En ciertas realizaciones preferidas, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una combinación de una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada de las siguientes posibilidades (i) a (ix):
- (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29 o un fragmento de la misma y la

- VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 36 o un fragmento de la misma,
- (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 35 o un fragmento de la misma,
- 5 (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 37 o un fragmento de la misma,
- (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 40 o un fragmento de la misma,
- (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 o un fragmento de la misma,
- 10 (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38 o un fragmento de la misma,
- (vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 41 o un fragmento de la misma,
- 15 (viii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42 o un fragmento de la misma,
- (ix) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 43 o un fragmento de la misma.
- En una realización preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3, seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (vi):
- 20 (i) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 14, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 14, CDR3: posiciones 116-125 de la SEQ ID NO: 14,
- (ii) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 15, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 15, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 15,
- 25 (iii) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 16, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 16, CDR3: posiciones 116-124 de la SEQ ID NO: 16,
- (iv) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 17, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 17, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 17,
- 30 (v) CDR1: posiciones 44-51 de la SEQ ID NO: 18, CDR2: posiciones 69-76 de la SEQ ID NO: 18, CDR3: posiciones 115-125 de la SEQ ID NO: 18 y
- (vi) CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19.
- En una realización preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (ix):
- 35 (i) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 20, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 20, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 20,
- (ii) CDR1: posiciones 49-53 de la SEQ ID NO: 21, CDR2: posiciones 71-73 de la SEQ ID NO: 21, CDR3: posiciones 110-118 de la SEQ ID NO: 21,
- 40 (iii) CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 22, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 22, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 22,
- (iv) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 23, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 23, CDR3: posiciones

115-123 de la SEQ ID NO: 23,

(v) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 24, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 24, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 24,

5 (vi) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 25, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 25, CDR3: posiciones 115-122 de la SEQ ID NO: 25,

(vii) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 26, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 26, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 26,

(viii) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 27, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 27, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 27 y

10 (ix) CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 28, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 28, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 28.

En una realización preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende una combinación de VH y VL, cada una de las cuales comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (ix):

15 (i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 14, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 14, CDR3: posiciones 116-125 de la SEQ ID NO: 14, VL: CDR1: posiciones 49-53 de la SEQ ID NO: 21, CDR2: posiciones 71-73 de la SEQ ID NO: 21, CDR3: posiciones 110-118 de la SEQ ID NO: 21,

20 (ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 15, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 15, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 20, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 20, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 20,

(iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 16, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 16, CDR3: posiciones 116-124 de la SEQ ID NO: 16, VL: CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 22, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 22, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 22,

25 (iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de la SEQ ID NO: 18, CDR2: posiciones 69-76 de la SEQ ID NO: 18, CDR3: posiciones 115-125 de la SEQ ID NO: 18, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 25, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 25, CDR3: posiciones 115-122 de la SEQ ID NO: 25,

(v) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 17, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 17, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 17, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 24, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 24, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 24,

30 (vi) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 23, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 23, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 23,

35 (vii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 26, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 26, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 26,

(viii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 27, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 27, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 27 y

40 (ix) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 28, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 28, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 28.

45 En otras realizaciones preferidas, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende preferiblemente una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2, preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2 descrito en el presente documento, y preferiblemente comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o las

- 5 regiones variables (VL) de cadena ligera descritas en la presente memoria. En una realización, dichas una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en la presente memoria. En una realización particularmente preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 comprende preferiblemente las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2, preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2 descrito en este documento, y preferiblemente comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de cadenas pesadas (VH) y/o regiones variables de cadena ligera (VL) descritas en la presente memoria.
- 10 En una realización, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en la presente memoria, comprende dichas CDR junto con sus regiones marco intervinientes. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente 50% de una o ambas de la primera y cuarta regiones marco, siendo el 50% el extremo terminal C de la primera región marco y el 50% del extremo terminal N de la cuarta región marco. La construcción de anticuerpos producidos por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos del extremo terminal N o C a las regiones variables codificadas por los enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluyendo la introducción de enlazadores para unir las regiones variables descritas en la presente memoria a otras secuencias de proteínas incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas de proteínas.
- 15 En una realización, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en la presente memoria, comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.
- 20 La referencia en la presente memoria descriptiva a un anticuerpo que comprende con respecto a su cadena pesada una cadena particular, o una región o secuencia particular preferiblemente se refiere a la situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica correspondientemente a la cadena ligera de un anticuerpo.
- 25 El término "ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir ADN y ARN. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, pero preferiblemente es un ADN bicatenario.
- 30 De acuerdo con la enseñanza, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser llevada a cabo en forma transitoria o de forma estable.
- 35 La enseñanza dada aquí con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, aquellas que se muestran en el listado de secuencias, deben ser interpretados de modo que se refieran también a variantes de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a CLDN18.2 y preferiblemente funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente memoria, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.
- 40 Los expertos en la técnica apreciarán que en particular las secuencias de la CDR, regiones hipervariable y variable pueden ser modificadas sin perder la capacidad de unirse a CLDN18.2. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en la presente memoria. Por "altamente homóloga" se contempla que se pueden hacer de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariable y variable pueden ser modificadas de manera que muestren una homología sustancial con las regiones de anticuerpos específicamente descritas en la presente memoria.
- 45 Para los propósitos de la presente invención, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de supresión de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de supresión de aminoácidos que comprenden la supresión en el extremo terminal N y/o el extremo terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento del extremo terminal N y/o del extremo terminal C.
- 50 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de particular aminoácidos. En el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que tiene una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con un cribado apropiado del producto resultante.
- 55

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxi-terminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos.

Las variantes de supresión de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como mediante la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las supresiones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque se elimina al menos un residuo en la secuencia y se inserta otro residuo en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que están en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas homólogas o péptidos y/o reemplazar aminoácidos por otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados de forma similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será de al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos de aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60% al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por al menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede hacer con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencias, por ejemplo, usando Align, usando ajustes estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, apertura de espacio 10,0, extensión del espacio 0,5.

La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que o bien son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias que se comparan, obtenida después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias están distribuidas aleatoriamente y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado óptimamente, realizándose dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede producirse, además manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén humano de cadena ligera y un transgén humano de cadena pesada o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti CLDN18.2 humanos cuando se inmuniza con antígeno CLDN18.2 y/o células que expresan CLDN18.2. El transgén humano de cadena pesada puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de ratones transgénicos, por ejemplo, ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén humano de cadena pesada puede mantenerse

extracromosómicamente, como es el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLDN18.2 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y conmutación de isotipo.

5 "Reducir", "disminuir" o "inhibir" tal como se usa en la presente memoria significa una disminución total o la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y más preferiblemente de 75% o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de expresión o en el nivel de proliferación de células.

10 Los términos tales como "aumento" o "mejoría" se refieren preferiblemente a un aumento o mejora de aproximadamente al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 100%, al menos 200%, al menos 500%, al menos 1.000%, al menos 10.000% o incluso más.

Mecanismos de acción de mAb

15 Los anticuerpos descritos en la presente memoria preferiblemente interactúan con componentes del sistema inmune, preferiblemente mediante ADCC o CDC. Los anticuerpos descritos en la presente invención también se pueden usar para dirigir cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para matar directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos complementarios de acción que pueden incluir respuestas inmunes antitumorales que pueden haber sido comprometidas debido a efectos secundarios citotóxicos de un compuesto quimioterapéutico sobre linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ejercer un efecto simplemente por unión a CLDN18.2 en la superficie celular, por lo tanto, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

ADCC describe la capacidad de matar células de las células efectoras como se describe en el presente documento, en particular linfocitos, que preferiblemente requiere que la célula objetivo sea marcada por un anticuerpo.

25 ADCC ocurre preferiblemente cuando los anticuerpos se unen a antígenos en células tumorales y los dominios Fc de anticuerpo se conectan con receptores Fc (FcR) sobre la superficie de células efectoras inmunes. Se han identificado varias familias de receptores Fc, y las poblaciones celulares específicas expresan característicamente expresan receptores Fc definidos. ADCC puede ser visto como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación de antígenos y la inducción de respuestas tumorales dirigidas a células T. Preferiblemente, la inducción *in vivo* de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas a tumor y a respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

Citotoxicidad dependiente del complemento

35 CDC es otro método de matar células que puede estar dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más eficaz para activación del complemento. IgG1 e IgG3 son también ambos muy eficaces para dirigir CDC a través de la clásica vía de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo da lugar a la disociación de múltiples sitios de unión C1q en estrecha proximidad en los dominios C_H2 de moléculas de anticuerpos participantes, tales como moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente, estos sitios de unión C1q disociados convierten la interacción C1q-IgG previamente de baja afinidad en uno de alta avidéz, que desencadena una cascada de eventos que implica una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula.

45 Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

50 El sistema animal preferido para preparar hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y el de conejo (por ejemplo, descrito en Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9348 (1995), véase también Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

5 En aún otra realización preferida, se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en el documento WO2004 035607

10 Otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de especificidad definida, por ejemplo, véase Babcock et al., 1996; una nueva estrategia para generar anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos únicos aislados que producen anticuerpos de especificidades definidas. Para detalles de la modificación genética de anticuerpos recombinantes véase también Welschof y Kraus, Recombinant Antibodies for Cancer Therapy ISBN-0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

15 Para generar anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con el vehículo derivado de la secuencia del antígeno, es decir, la secuencia contra la que han de dirigirse los anticuerpos, una preparación enriquecida de antígeno expresado de forma recombinante o fragmentos de los mismos y/o células que expresan el antígeno, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el antígeno o sus fragmentos. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan el antígeno, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

20 La respuesta inmune puede controlarse durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen a través de la vena de la cola o sangrados retroorbitales. Se pueden usar ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina para fusiones. Los ratones pueden ser reforzados en forma intraperitoneal o intravenosa con células que expresan el antígeno 3 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo para aumentar la tasa de hibridomas específicos que secretan anticuerpos.

25 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, se pueden aislar y fusionar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden entonces ser seleccionados para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales pueden entonces ser examinados por ELISA para detectar hibridomas que secretan anticuerpos. Mediante el análisis de inmunofluorescencia y FACS usando células que expresan antígenos, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden sembrarse nuevamente en placa, seleccionarse de nuevo, y si todavía son positivos para los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden luego cultivarse *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para caracterización.

30 También pueden producirse anticuerpos en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como son bien conocidos en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

35 Por ejemplo, en una realización, el gen o genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse a un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el usado por el sistema de expresión de genes GS descrito en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonado puede introducirse en células huésped eucarióticas tales como células CHO, células NS/O, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células de hongos o levaduras. El método utilizado para introducir estos genes pueden ser métodos descritos en la técnica tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpo en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden ser identificadas y seleccionadas. Estas células representan los transfectomas que pueden ser amplificados para su nivel de expresión y aumentados para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

40 Alternativamente, los genes de anticuerpo clonado pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariontas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tales como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase, por ejemplo, Verma, R., et al., (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al., (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; Y Fischer, R., et al., (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos se pueden usar como anticuerpos terapéuticos en humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radiactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente conduciendo a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los anticuerpos respectivos son quimerizados o humanizados. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra uniendo las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, como se describe en Kraus et al., en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant Antibodies for Cancer Therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una realización preferida, los anticuerpos quiméricos se generan uniendo la región constante cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En una realización también preferida, pueden generarse anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de cadena ligera lambda humana con la región variable de cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado sobre secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., (1998) *Nature* 332: 323-327, Jones, P. et al., (1986) *Nature* 321: 522-525 y Queen, C. et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033). Tales secuencias del marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal se diferencian de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables ensamblados completamente, los cuales están formados por la unión de V (D) J durante la maduración de células B. Las secuencias de los genes de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo igualmente a través de la región variable.

La capacidad de los anticuerpos para unirse a un antígeno se puede determinar usando ensayos de unión convencionales (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, Inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

Para purificar anticuerpos, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces giratorios de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes se pueden filtrar y, si es necesario, concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora se puede intercambiar en PBS, y la concentración puede determinarse mediante DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen a epítomos únicos, se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio o dirigida a múltiples sitios.

Para determinar el isotipo de anticuerpos, pueden realizarse isotipos ELISA con diversos kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pozos de placas de microtitulación se pueden recubrir con Ig anti-ratón. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pozos pueden entonces hacerse reaccionar con cualquiera de las sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, IgA o IgM de ratón. Después del lavado, las placas se pueden desarrollar con sustrato ABTS (1 mg/mL) y se analizan a una DO de 405-650. Alternativamente, se puede usar el kit de isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Nº de catálogo 1493027 de Roche) como se describe por el fabricante.

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan naturalmente o después de transfección el antígeno y los controles negativos que carecen de expresión de antígeno (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene 1% de FBS y pueden incubarse a

- 4°C durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti-IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse a un anticuerpo monoclonal unido a antígeno en las mismas condiciones que la tinción con anticuerpos primarios. Las muestras se pueden analizar por citometría de flujo con un instrumento FACS utilizando la luz y las propiedades de dispersión lateral para dar entrada en células vivas individuales. Con el fin de distinguir anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de aglutinantes no específicos en una sola medición, se puede emplear el método de co-transfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican antígeno y un marcador fluorescente pueden teñirse como se ha descrito anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpos. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno se unen preferencialmente a las células que expresan el marcador de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una relación comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia además o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.
- Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, se puede usar análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que se expresan espontáneamente o después del antígeno de transfección y los controles negativos que carecen de expresión de antígeno se hacen crecer en portaobjetos de cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, complementado con suero fetal de ternera al 10% (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Las células pueden fijarse luego con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratamiento. Las células pueden entonces hacerse reaccionar con anticuerpos monoclonales contra el antígeno durante 30 min a 25°C. Después del lavado, las células se pueden hacer reaccionar con un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) bajo las mismas condiciones. Las células pueden entonces ser examinadas por microscopía de fluorescencia.
- Se pueden preparar extractos celulares de células que expresan antígeno y controles negativos apropiados y se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se probarán con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión a IgG se puede detectar usando peroxidasa de IgG anti-ratón y se desarrolla con sustrato ECL.
- Los anticuerpos se pueden ensayar adicionalmente con respecto a la reactividad con antígeno mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, utilizando criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído a partir de muestras de tejido no canceroso o tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos de rutina o de ratones que portan tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan espontáneamente o después de transfección del antígeno. Para inmunotinción, se pueden incubar anticuerpos reactivos al antígeno seguido por anticuerpos de anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.
- Los anticuerpos se pueden analizar en cuanto a su capacidad para mediar la fagocitosis y la muerte de células que expresan CLDN18.2. El ensayo de la actividad del anticuerpo monoclonal *in vitro* proporcionará un cribado inicial antes de analizar modelos *in vivo*.
- 40 Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC):**
- Brevemente, las células polimorfonucleares (PMN), las células NK, los monocitos, las células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos pueden purificarse mediante centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI complementado con suero fetal de ternera al 10% inactivado por calor o, alternativamente con suero humano al 5% inactivado por calor y mezclado con células objetivo marcadas con ⁵¹Cr que expresan CLDN18.2, a diferentes relaciones de células efectoras con respecto a células objetivo. Alternativamente, las células objetivo se pueden marcar con un ligando que intensifica la fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de europio con el ligando intensificador que se libera de las células muertas se puede medir con un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células objetivo con luciferasa. El amarillo lucifer añadido puede ser oxidado sólo por células viables. Las IgG anti-CLDN18.2 purificadas pueden añadirse entonces a diversas concentraciones. Se puede usar IgG humana no relevante como control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 4 a 20 horas a 37°C dependiendo del tipo de célula efectora utilizado. Las muestras se pueden ensayar para citólisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida de células viables.
- Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN18.2 también pueden ensayarse en diversas combinaciones para determinar si la citólisis se mejora con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Los anticuerpos anti-CLDN18.2 monoclonales pueden ensayarse en cuanto a su capacidad para mediar CDC usando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento puede obtenerse a partir de la sangre de una manera conocida por el experto en la técnica. Para determinar la actividad de CDC de los mAb, pueden usarse diferentes métodos. La liberación de ^{51}Cr puede medirse por ejemplo o elevarse la permeabilidad de la membrana usando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). En pocas palabras, las células objetivo se pueden lavar y se pueden incubar 5×10^5 /mL con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C . A continuación, se puede añadir suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células se incuban a 37°C durante 20-30 min. Todas las células de cada muestra se pueden añadir a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede entonces analizarse inmediatamente por análisis de citometría de flujo usando un arreglo de FACS.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC se puede determinar en células adherentes. En una realización de este ensayo, las células se siembran 24 h antes del ensayo con una densidad de 3×10^4 /pozo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. Al día siguiente se remueve el medio de crecimiento y se incuban las células por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contiene saponina al 0,2% para la determinación de lisis de fondo y lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 min a temperatura ambiente se remueve el sobrenadante y se añade a las células plasma o suero humano al 20% (v/v) en DMEM (precalentado a 37°C) y se incuba durante otros 20 min a 37°C . Todas las células de cada muestra se añaden a una solución de yoduro de propidio ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$). A continuación, los sobrenadantes se reemplazan por PBS que contiene $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio y se mide la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm a 600 nm usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula como sigue: %de lisis específica = (fluorescencia de la muestra – fluorescencia de fondo)/(fluorescencia de lisis máxima - fluorescencia de fondo) x 100.

Inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

Para ensayar la capacidad para iniciar la apoptosis, los anticuerpos anti-CLDN18.2 monoclonales pueden incubarse, por ejemplo, con células tumorales positivas para CLDN18.2, por ejemplo, células tumorales transfectadas con SNU-16, DAN-G, KATO-III o CLDN18.2 a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden ser recolectadas, lavadas en regulador de unión a Anexina V (BD biosciences), e incubadas con Anexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante 15 min en la oscuridad. Todas las células de cada muestra se pueden añadir a la solución PI ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS) en un tubo FACS y se evalúan inmediatamente mediante citometría de flujo (como anteriormente). Alternativamente, se puede detectar una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits comercialmente disponibles. El kit de proliferación de células DELFIA (Perkin-Elmer, catálogo N°. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta utilizando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, se fijan las células y se desnaturaliza el ADN utilizando solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se añade inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida, utilizando fluorometría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

Estudios preclínicos

Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLDN18.2 también se pueden ensayar en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones deficientes inmunodeficientes que portan tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLDN18.2, por ejemplo, DAN-G, SNU-16 o KATO- III o después de la transfección, por ejemplo, HEK293) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan CLDN18.2.

Los estudios *in vivo* después de xenoinjerto de células tumorales que expresan CLDN18.2 en ratones inmunocomprometidos u otros animales pueden realizarse utilizando anticuerpos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones libres de tumor seguido por la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para prevenir la formación de tumores o síntomas relacionados con tumores. Se pueden administrar anticuerpos a ratones portadores de tumores para determinar la eficacia terapéutica de anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento de tumores, metástasis o síntomas relacionados con tumores. La aplicación de anticuerpos puede combinarse con la aplicación de otras sustancias como fármacos citostáticos, inhibidores del factor de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la toxicidad potencial de las combinaciones. Para analizar efectos secundarios tóxicos mediados por anticuerpos, los animales pueden ser inoculados con anticuerpos o reactivos de control y estudiados a fondo para detectar posibles síntomas relacionados con la terapia con anticuerpos CLDN18.2. Los posibles efectos secundarios de la aplicación *in vivo* de anticuerpos CLDN18.2 incluyen particularmente la toxicidad en tejidos que expresan CLDN18.2 incluyendo estómago. Anticuerpos que reconocen CLDN18.2 en seres humanos y en otras especies, por ejemplo, s ratones son particularmente útiles para predecir efectos secundarios potenciales mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales CLDN18.2 en seres humanos.

El mapeo de epítomos reconocidos por anticuerpos se puede realizar como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)" de Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en "Epitope Mapping: A practical Approach" Practical Approach Series, 248 de Olwyn MR Westwood, Frank C. Hay.

5 Los compuestos y agentes descritos en la presente invención pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una manera ya conocida. Una composición farmacéutica puede, por ejemplo, estar en forma de una solución o suspensión.

10 Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias reguladoras, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

15 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la enseñanza. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de forma no limitativa las preparadas a partir de los ácidos siguientes: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico y succínico. Las sales farmacéuticamente aceptables también pueden prepararse como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

20 Las sustancias reguladoras adecuadas para uso en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Los conservantes adecuados para uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como lactato de Ringer.

25 El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar, mejorar o permitir la aplicación. De acuerdo con la enseñanza, el término "portador" también incluye uno o más rellenos, diluyentes o sustancias de encapsulación sólidas o líquidas compatibles, que son adecuados para la administración a un paciente.

30 Las sustancias portadoras posibles para administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de láctido biocompatible, copolímeros de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

El término "excipiente", cuando se usa en la presente invención, pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensoactivos, conservantes, emulsionantes, reguladores, agentes saborizantes o colorantes.

35 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral incluyendo por inyección o infusión. La administración es preferiblemente parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

40 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden usualmente una preparación estéril acuosa o no acuosa del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de portadores y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, usualmente se usan aceites fijos estériles como medio de solución o suspensión.

45 Los agentes y composiciones descritos en el presente documento se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso de tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende retardar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una condición también puede ser un retraso del inicio o una prevención del inicio de dicha enfermedad o de dicha afección.

Una cantidad eficaz de un agente o composición descrita en la presente memoria dependerá de la afección a tratar, de

5 la gravedad de la enfermedad, de los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, la condición fisiológica, el tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia acompañante (si está presente), la vía de administración específica y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente memoria pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas logradas por una vía de administración diferente, más localizada).

10 Los agentes y composiciones descritos en la presente memoria pueden administrarse a pacientes, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir una diversidad de trastornos tales como los descritos en la presente memoria. Los pacientes preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que se pueden corregir o mejorar mediante la administración de los agentes y composiciones descritos en la presente memoria. Esto incluye trastornos que implican células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de CLDN18.2.

Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar a un paciente con una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa tal como se describe en este documento caracterizada por la presencia de células cancerosas que expresan CLDN18.2.

15 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza pueden usarse también para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en el presente documento.

La presente enseñanza se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplos

20 Ejemplo 1: La expresión de CLDN18.2 de líneas celulares de cáncer gástrico humano se estabiliza mediante el tratamiento *in vitro* con agentes quimioterapéuticos

25 Se cultivaron células KatoIII, una línea celular tumoral gástrica humana, en medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía FCS al 20% (Perbio) y Glutamax 2 mM (Invitrogen) a 37°C y CO₂ al 5%, con o sin compuestos citostáticos. Se ensayó la epirubicina (Pfizer) a una concentración de 10 o 100 ng/mL, se ensayó 5-FU (Neofluor de NeoCorp AG) a una concentración de 10 o 100 ng/mL y se ensayó oxaliplatino (Hospira) a una concentración de 50 o 500 ng/mL. Se utilizó también una combinación de los tres compuestos (EOF; epirubicina 10 ng/mL, oxaliplatino 500 ng/mL, 5-FU 10 ng/mL). Se cultivaron 8 x 10⁵ células KatoIII durante 96 horas sin cambio de medio o durante 72 horas, seguido de cultivo durante 24 horas en medio estándar para liberar células de la detención del ciclo celular en una placa de cultivo de tejido de 6 pozos a 37°C, CO₂ al 5%. Las células se recogieron con EDTA/tripsina, se lavaron y se analizaron.

30 Para la detección extracelular de CLDN18.2, se tiñeron las células con el anticuerpo monoclonal anti-CLDN18.2 IMAB362 (Ganymed) o un anticuerpo de control asociado con isotipo (Ganymed). Como reactivo secundario se usó anti-hulG-APC de cabra de Dianova.

35 Las etapas del ciclo celular se determinaron con base en la medición del contenido de ADN celular. Esto permite discriminar entre las células en la fase G1, S o G2 del ciclo celular. En la fase S se produce la duplicación del ADN mientras que en la fase G2 las células crecen y se preparan para la mitosis. El análisis del ciclo celular se realizó usando el kit de reactivos de ADN CycleTEST PLUS de BD Biosciences siguiendo el protocolo del fabricante. La adquisición y el análisis de la citometría de flujo se realizaron utilizando el software BD FACS Cantoll (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star).

40 Las columnas en las Figuras 1a y 1b muestran el porcentaje respectivo de células en la fase G1, S o G2 del ciclo celular. Las células KatoIII cultivadas en medio muestran una detención del ciclo celular predominantemente en la fase G1. Las células tratadas con 5-FU se bloquean predominantemente en la fase S. Las células KatoIII tratadas con epirubicina o EOF muestran una detención del ciclo celular predominantemente en la fase G2. Las células KatoIII tratadas con oxaliplatino muestran enriquecimiento de células predominantemente en las fases G1 y G2. Como puede verse en la Figura 1c, una detención del ciclo celular en la fase S o la fase G2 da como resultado la estabilización o sobreexpresión de CLDN18.2. Tan pronto como las células se liberan de cualquier fase del ciclo celular (Figura 1b) la expresión de CLDN18.2 en la superficie celular de células KatoIII se sobreexpresa (Figura 1d).

45 Se trataron células NUGC-4 y KATO III con 5-FU + OX (10 ng/mL de 5-FU y 500 ng/mL de oxaliplatino), EOF (10 ng/mL de epirubicina, 500 ng/mL de oxaliplatino y 10 ng/mL de 5-FU) o FLO (10 ng/mL de 5-FU, 50 ng/mL de ácido folínico y 500 ng/mL de oxaliplatino) durante 96 horas. El ARN de las células NUGC-4 y KATO III previamente tratadas con quimioterapia se aisló y se convirtió en ADNc. Se analizó el nivel de transcripción de CLDN18.2 por PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados se muestran en la Figura 2a como expresión relativa en comparación con el nivel de transcripción del gen de mantenimiento HPRT. La Figura 2b muestra una transferencia Western de CLDN18.2 y el control de la carga de actina de células NUGC-4 no tratadas y tratadas. La intensidad de la señal de luminiscencia se muestra en relación con la actina en porcentaje.

El pretratamiento de células NUGC-4 y KATO III con EOF, FLO, así como quimioterapias de combinación 5-FU + OX da como resultado un aumento de los niveles de ARN y proteína de CLDN18.2 como se muestra por PCR cuantitativa en tiempo real (Figura 2a) y Western blot (Figura 2b).

5 Se analizó la unión de IMAB362 a células de cáncer gástrico NUGC-4 y KATO III tratadas con EOF (10 ng/mL de epirubicina, 500 ng/mL de oxaliplatino y 10 ng/mL de 5-FU) o FLO (10 ng/mL 5-FU, 50 ng/mL de ácido folínico y 500 ng/mL de oxaliplatino) durante 96 horas mediante citometría de flujo. La cantidad de proteína CLDN18.2 que se puede segmentar mediante IMAB362 en la superficie de las líneas celulares de cáncer gástrico se incrementa como se muestra en la Figura 2c. Este efecto fue más prominente en células previamente tratadas con EOF o FLO.

10 Las células KatolIII se trataron previamente durante 4 días con irinotecano o docetaxel y se analizaron para determinar la expresión de CLDN18.2 y la detención del ciclo celular. El tratamiento de las células con irinotecano dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento celular y una detención del ciclo celular en la fase S/G2 (Figura 3). El tratamiento de las células con docetaxel dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento celular y una detención del ciclo celular en la fase G2 (Figura 3).

15 Ejemplo 2: El pretratamiento de células de cáncer gástrico humano con compuestos quimioterapéuticos da como resultado una mayor eficacia de ADCC mediada por IMAB362

20 Se investigó la ADCC mediada por IMAB362 usando células de cáncer gástrico NUGC-4 como objetivo, las cuales fueron tratadas previamente con 10 ng/mL de 5-FU y 500 ng/mL de oxaliplatino (5-FU + OX), 10 ng/mL de epirubicina, 500 ng/mL de oxaliplatino y 10 ng/mL de 5-FU (EOF) o 10 ng/mL de 5-FU, 50 ng/mL de ácido folínico y 500 ng/mL de oxaliplatino (FLO) durante 96 horas (relación efector:objetivo 40:1) o no tratadas. Los valores de EC_{50} se obtuvieron de 7 donantes sanos para células NUGC-4 no tratadas y tratadas previamente con EOF, FLO o 5-FU + OX.

Como se muestra en la Figura 4a, las curvas de dosis/respuesta en las células tratadas previamente se desplazaron hacia arriba y hacia la izquierda en comparación con las células objetivo no tratadas. Esto dio lugar a una mayor lisis máxima y a una disminución de los valores de EC_{50} a un tercio de las células no tratadas (Figura 4b).

25 Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) incluyendo células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras de donantes humanos sanos por centrifugación con densidad de Ficoll Hypaque. Las células efectoras lavadas se sembraron en medio X-Vivo. Las células KatolIII que expresan CLDN18.2 endógena y son de origen gástrico se utilizaron como células objetivo en esta composición. Las células objetivo expresaron luciferasa en forma estable, amarillo lucifer, que es oxidado sólo por células viables. Se añadió anticuerpo anti-CLDN18.2 purificado IMAB362 a diversas concentraciones y como anticuerpo de control de isotipo se usó un anticuerpo hulgG1 quimérico irrelevante. Las muestras se analizaron para determinar la citólisis midiendo la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer que es un valor para la cantidad de células viables que quedaron después de la citotoxicidad inducida por IMAB362. Se compararon KatolIII previamente tratadas durante 3 días con irinotecano (1.000 ng/mL), docetaxel (5 ng/mL) o cisplatino (2.000 ng/mL) con células objetivo cultivadas con medio no tratado y se cuantificó la ADCC inducida por IMAB362.

35 Las células KatolIII tratadas previamente durante 3 días con irinotecano, docetaxel o cisplatino exhibieron un nivel inferior de células viables en comparación con las células objetivo cultivadas en medio (Figura 5a) y la expresión de claudina18.2 en células tratadas previamente con irinotecano, docetaxel o cisplatino aumentó en comparación con células cultivadas en medio (Figura 5b).

40 Además, el pretratamiento de células KatolIII con irinotecano, docetaxel o cisplatino aumentó la potencia de IMAB362 para inducir ADCC (Figura 5c, d).

Ejemplo 3: La quimioterapia da como resultado una mayor eficacia de la CDC inducida por IMAB362

45 Los efectos de los agentes quimioterapéuticos sobre CDC inducida por IMAB362 se analizaron tratando previamente células de cáncer gástrico KATO III con 10 ng/mL de 5-FU y 500 ng/mL de oxaliplatino (5-FU + OX) durante 48 horas. Las curvas de respuesta a dosis representativas de CDC inducida por IMAB362 usando células KATO III quimioterapéuticas tratadas previamente se muestran en la Figura 6. El tratamiento previo de células tumorales durante 48 horas aumentó la potencia de IMAB362 para inducir CDC, dando como resultado una mayor lisis máxima de células tumorales tratadas previamente en comparación con células no tratadas.

Ejemplo 4: La capacidad de las células efectoras inmunes para ejecutar ADCC mediada por IMAB362 no se ve comprometida por el tratamiento con compuestos quimioterapéuticos

50 Los agentes quimioterapéuticos usados en el régimen de EOF o FLO son altamente potentes en la inhibición de la proliferación de células objetivo. Para investigar los efectos adversos de la quimioterapia en las células efectoras, las PBMC de donantes sanos fueron tratadas con 10 ng/mL de epirubicina, 500 ng/mL de oxaliplatino y 10 ng/mL de 5-FU

5 (EOF) o 10 ng/mL de 5-FU, 50 ng/mL de ácido fólico y 500 ng/mL de oxaliplatino (FLO) durante 72 horas antes de la aplicación en ensayos de ADCC. La Figura 7a muestra los valores de EC₅₀ de 4 donantes sanos y la Figura 7b muestra las curvas de dosis/respuesta representativas de ADCC inducida por IMAB362 usando células efectoras tratadas previamente con EOF o FLO. La ADCC inducida por IMAB362 de células de carcinoma gástrico NUGC-4 no está comprometida debido a las quimioterapias con EOF o FLO.

Ejemplo 5: Una combinación de los resultados del tratamiento con ZA/IL-2 en la expansión optimizada de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

10 El efecto de ZA/IL-2 sobre la proliferación de cultivos de PBMC se evaluó *in vitro*. Se recogieron PCB de donantes humanos sanos y se trataron los cultivos con una dosis única de ZA. Se añadió IL-2 cada 3-4 días. Específicamente, las PBMC derivadas de 3 donantes humanos sanos diferentes (# 1, # 2, # 3) se cultivaron en medio RPMI (1x10⁶ células/mL) durante 14 días con ZA 1 µM más dosis altas (300 U/mL) o bajas (25 U/mL) de IL-2; consultar la Figura 8a. Las PBMC de los mismos donantes se cultivaron adicionalmente en medio RPMI durante 14 días con 300 U/mL de IL-2 más ZA o sin ZA; consultar la Figura 8b. El aumento en el número de células se determinó contando las células vivas en el día 6, 8, 11 y 14.

15 En el medio suministrado con una dosis alta de IL-2, se expandieron aproximadamente 2-5 veces más células, en comparación con los cultivos suministrados con una dosis baja de IL-2 (Figura 8a). La expansión de las células en medio sin ZA fue aproximadamente dos veces menor en comparación con las células cultivadas en medio con ZA (Figura 8b). Estos datos muestran la necesidad de aplicar ambos compuestos ZA e IL-2 en combinación para asegurar la expansión apropiada de las células.

20 Ejemplo 6: El tratamiento con ZA/IL-2 da como resultado la expansión de grandes cantidades de células T Vγ9Vδ2 en cultivos de PBMC

25 Las PBMC se cultivaron durante 14 días en medio RPMI suplementado con 300 U/mL de IL-2 y con o sin ZA 1 µM. El porcentaje de células T Vγ9+Vδ2+ dentro de la población de linfocitos CD3+ (Figura 9a) y el porcentaje de células CD16+ dentro de la población de células T CD3+Vγ9+Vδ2+ (Figura 9b) se determinó mediante FACS multicolor el día 0 y el día 14. Resultados se anotaron para cada donante en el diagrama de dispersión. La Figura 9c muestra un gráfico de dispersión que muestra el incremento en el tiempo (enriquecimiento) del número de células T CD3+ Vγ9+Vδ2+ y CD3+CD16+ Vγ9+Vδ2+ dentro de la población de linfocitos. Se tuvieron en cuenta la cantidad de células sembradas en el día 0 y la cantidad de células recolectadas el día 14.

30 La adición de IL-2 en los cultivos de PBMC es necesaria para la supervivencia y crecimiento de linfocitos. Se expanden eficientemente en cultivos abastecidos con 300 U/mL de IL-2. El análisis FACS utilizando anticuerpos específicos Vγ9 y Vδ2 revelan que la adición de ZA/IL-2 específicamente induce la acumulación de T células Vγ9Vδ2 (Figura 9a). Después de 14 días, la población de linfocitos CD3+ puede comprender hasta 80% de las células T Vγ9Vδ2. Una porción de células T Vγ9Vδ2 expresa CD16, mientras que el enriquecimiento de estas células dentro de la población de linfocitos CD3+ es de 10-700 veces, dependiendo del donante (Figuras 9b y 9c). El enriquecimiento de las células T CD16+Vγ9+Vδ2+ en los cultivos es 10-600 veces mayor en comparación con los cultivos que se desarrollaron sin ZA (Figura 9c). Concluimos que el tratamiento con ZA/IL-2 de PBMC *in vitro* resulta en la sobreexpresión del receptor CD16 de FcγIII que media la ADCC en una proporción significativa de células T γδ.

Ejemplo 7: La IL-2 afecta la expansión de las células T Vγ9Vδ2 de una manera dependiente de la dosis

40 La adición de ZA en los cultivos es el factor más importante para inducir el desarrollo de células T Vγ9Vδ2. Es bien sabido que la IL-2 es necesaria para el crecimiento y la supervivencia de las células T.

45 Las PBMC se cultivaron durante 14 días en medio RPMI complementado con ZA 1 µM y concentraciones crecientes de IL-2. Se añadió IL-2 el día 0 y el día 4. El enriquecimiento de células T CD16+Vγ9+Vδ2+ dentro de la población de linfocitos CD3+ se determinó mediante tinción FACS multicolor el día 0 y el día 14. Para comparar los diferentes donantes, se estableció como 100% la cantidad de células T CD16+Vγ9+Vδ2+ recolectadas después del cultivo con 600 U/mL de IL-2; consultar la Figura 10, a la izquierda. Además, se analizó la actividad de ADCC de los cultivos aislados que se desarrollaron durante 14 días en concentraciones crecientes de IL-2; consultar la Figura 10, a la derecha.

50 Se confirmó por análisis de respuesta a la dosis que IL-2 también estimula el crecimiento y la supervivencia del subgrupo de células T Vγ9Vδ2. Mediante la adición de concentraciones bajas de IL-2 en el medio, se encontró una correlación entre la dosis de IL-2 y el porcentaje de células T CD16+Vγ9Vδ2 dentro de la población de linfocitos CD3+ (Figura 10, a la izquierda). La actividad de ADCC de las células cultivadas en concentraciones mayores de IL-2 (150-600U/mL) se mejora en comparación con las células cultivadas en concentraciones bajas de IL-2 (Figura 10, a la derecha).

Ejemplo 8: ZA induce la producción de IPP en monocitos y células cancerosas que estimulan ambas la expansión de las

células T V γ 9V δ 2

5 Se incubaron PBMC frescas (Exp. # 1) o cultivos de células T V γ 9V δ 2 estimuladas con ZA/IL-2 el día 14 (Exp. # 2-5) ya sea sin monocitos (relación efector:monocito 1:0), con 0,2 veces (4:1) o 5 veces (relación 1:4) la cantidad de monocitos \pm ZA 1 μ M. El enriquecimiento de células T V γ 9V δ 2 en los cocultivos después de 14 días se determinó mediante FACS multicolor, mientras que la expansión del cultivo se consideró en el cálculo. El factor de enriquecimiento de células T V γ 9V δ 2 cultivadas con monocitos en una relación 1:4 se fijó en 100% para cada experimento. El aumento de monocitos en el cultivo dio como resultado un enriquecimiento de las células T V γ 9V δ 2 de más de 10 veces. Este efecto era claramente dependiente de ZA; consultar la Figura 11a.

10 Además, se trataron previamente células de cáncer de estómago humano (NUGC-4-luciferasa) y células de cáncer de estómago murino (CLS103 teñidas con calceína) con o sin ZA 5 μ M durante 2 días. Las células T V γ 9V δ 2 humanas se purificaron por MACS (día 14) y se cocultivaron con las células de cáncer durante 24 h. Se determinó la citotoxicidad de las células T V γ 9V δ 2 frente a células objetivo no tratadas y tratadas con ZA midiendo la actividad restante de luciferasa o la fluorescencia de calceína; consultar la Figura 11b. Se trataron previamente las células objetivo (NUGC-4 y CLS103) con o sin ZA 5 μ M durante 2 días y posteriormente se incubaron durante 4 h con mitomicina c (50 MI) para detener la proliferación. Se añadieron células T V γ 9V δ 2 humanas en reposo de 14 d de edad purificadas por MACS y 3 H-timidina a las células objetivo y se incubaron los cocultivos durante 48 h a 37°C. La proliferación se determinó midiendo la incorporación de 3 H-timidina en el ADN usando un contador de centelleo MicroBeta. La proliferación de células objetivo no tratadas con células ZA y sin células T V γ 9V δ 2 se fijó en 100%; consultar la Figura 11c.

20 Tal como se muestra en las Figuras 11b y 11c, las células de cáncer humano pulsadas con ZA activaron las células T V γ 9V δ 2 en términos de citotoxicidad (5-10 veces) y proliferación (1,4-1,8 veces), mientras que la línea celular de cáncer murino CLS103 no consiguió provocar estos efectos células T V γ 9V δ 2.

Ejemplo 9: El tratamiento con ZA/IL-2 afecta la composición de cultivos de PBMC

25 El crecimiento y la diferenciación de tipos de células específicos en cultivos de PBMC depende de la presencia de citoquinas. Estos componentes se añaden al medio (por ejemplo, factores de crecimiento presentes en el suero, IL-2) o secretados por las propias células inmunes. El tipo de células que evoluciona depende también de la composición inicial de las PBMC y de las dotaciones genéticas. Para analizar el aumento global de células efectoras (células NK y células T V γ 9V δ 2) se cultivaron PBMC de 10 donantes diferentes en presencia de 300 U/mL de IL-2 y con o sin ZA 1 μ M durante 14 días. La cantidad de células efectoras dentro de la población de linfocitos se identificó mediante tinción de FACS multicolor usando anticuerpos CD3, CD16, CD56, V γ 9 y V δ 2. Las células CD3-CD56+CD16+ representan las células NK y CD3+V γ 9+V δ 2+ representan las células T V γ 9V δ 2.

30 El análisis FACS multicolor reveló que tras el tratamiento con IL-2 se desarrollan principalmente células NK, mientras que en cultivos tratados con ZA/IL-2 las células T V γ 9V δ 2 se expanden predominantemente (Figura 12).

Ejemplo 10: El tratamiento con ZA/IL-2 genera células T de memoria efectora V γ 9V δ 2+

35 Las subpoblaciones de linfocitos T se pueden delinear con la ayuda de dos marcadores de superficie, la isoforma de alto m.w. del antígeno de linfocitos comunes CD45RA y el receptor de quimioquina CCR7. CCR7+ sin alterar y las células T de memoria central (CM) se caracterizan por la capacidad de circular repetidamente en los ganglios linfáticos y encontrar antígeno. Por el contrario, la memoria efectora (EM) y los linfocitos T efectores RA+ (TEMRA) subregulan CCR7 y parecen especializados en migrar a tejidos no linfoides periféricos, por ejemplo, a sitios infectados o tumorales. Las células EM pueden subdividirse adicionalmente con base en la expresión diferencial de CD27 y CD28. La pérdida progresiva de la expresión superficial de CD28 y CD27 es concomitante con la sobrerregulación de la capacidad citolítica de las células. Además, el nivel de CD57 se correlaciona con la expresión de granzimas y perforinas y por lo tanto representa un tercer marcador que muestra citotoxicidad/maduración celular.

40 Las PBMC se cultivaron con o sin ZA 1 μ M y 300 U/mL de IL-2 durante 14 días. La expresión de los diferentes marcadores de superficie se determinó mediante análisis FACS multicolor el día 0 (PBMC) y el día 14. Las células sin alterar son CD45RA+CCR7+, las células de memoria central (CM) son CD45RA-CCR7+, TEMRA son CD45RA+ CCR7- y las células efectoras de memoria (EM) son negativas para ambos marcadores; consultar la Figura 13a. Además, la actividad citolítica de las células T V γ 9V δ 2 se determinó mediante tinción por marcadores CD27 y CD57; consultar la Figura 13b, c. Además, el desarrollo de características similares a las células NK importantes para la actividad de ADCC, se analizó mediante tinción de células CD3+ con CD16 (unión de anticuerpo) y CD56 (adhesión); consultar la Figura 13d.

50 El análisis FACS multicolor de las células T V γ 9V δ 2 reveló que el tratamiento con ZA/IL-2 estimula claramente el desarrollo de células T V γ 9V δ 2 del tipo EM que son CD27- y CD57+ (Figura 13b-c). Además de una actividad citolítica mejorada, se observó que está involucrado un aumento en el nivel de CD16 y CD56, que son conocidos a partir de células NK (CD3- CD16+ CD56+) en ADCC en la población CD3+ (Figura 13d).

Tomados en conjunto, estos datos implican que el tratamiento con ZA de PBMC da como resultado el desarrollo de células T efectoras de memoria CD16+V γ 9+V δ 2+, que son capaces de migrar a tejidos no linfoides periféricos y que muestran marcadores de alta actividad citolítica. En combinación con el anticuerpo IMAB362 dirigido al tumor, estas células están muy bien aprovechadas para migrar a, dirigir y matar células tumorales.

5 Ejemplo 11: Las células T V γ 9V δ 2 expandidas con ZA/IL-2 son potentes efectores para ADCC dependiente de CLDN18.2 mediada por IMAB362

10 Similar a las células NK, las células T V γ 9V δ 2 expandidas con ZA/IL-2 son positivas para CD16 (véanse las Figuras 9 y 13), el receptor Fc γ R111 a través del cual un anticuerpo unido a la célula desencadena la ADCC. Para evaluar si las células T V γ 9V δ 2 son capaces de inducir una ADCC potente junto con IMAB362, se ha llevado a cabo una serie de experimentos.

15 Se cultivaron PBMC derivadas de 2 donantes diferentes (# 1 y # 2) en medio con 300 U/mL de IL-2 y con o sin ZA 1 μ M. Después de 14 días se recolectaron las células y se añadieron concentraciones crecientes (0,26 ng/mL-200 μ g/mL) de células IMAB362 a células NUGC-4 que expresaban CLDN18.2. Se determinó la muerte específica en ensayos de luciferasa; consultar la Figura 14a. La Figura 14b, c, da una visión general de los ensayos de ADCC realizados con 27 donantes cultivados en 300 U/mL de IL-2 y con o sin ZA. NUGC-4 sirvieron como células objetivo. Para cada donante, se calcularon los valores de EC₅₀ (b) a partir de las curvas de respuesta a la dosis y se calificó la tasa máxima de muerte específica a una dosis de 200 μ g/mL de IMAB362 (c) en los diagramas de dispersión.

20 Se observó una actividad fuerte de ADCC dependiente de IMAB362 contra células NUGC-4 positivas para CLDN18.2 usando PBMC cultivadas durante 14 días con ZA/IL-2 (Figura 14a). Usando cultivos de PBMC tratados con ZA/IL-2, ADCC depende de la presencia de células T V γ 9V δ 2 (Figuras 12 y 15). Si las células se cultivan sin ZA, la actividad de ADCC se reduce para la mayoría de los donantes. En estos cultivos, la actividad de ADCC residual es dependiente de las células NK (Figuras 11 y 14). Analizando más de 20 donantes, los ensayos de ADCC revelaron que el tratamiento con ZA/IL-2 de PBMC mejora la EC₅₀ y la tasa máxima de muerte específica en comparación con PBMC cultivadas solamente con IL-2.

25 Además, se cultivaron PBMC de dos donantes diferentes (# 1 + # 2) con ZA 1 μ M y 300 U/mL de IL-2. Estos cultivos de células efectoras se usaron en ensayos ADCC con líneas celulares objetivo humanas positivas (NUGC-4, KATO III) y negativas (SK-BR-3) para CLDN18.2 (relación de E:T 40:1). Se añadieron cantidades crecientes (0,26 ng/mL-200 μ g/mL) de anticuerpo IMAB362. Se midió ADCC en ensayos de luciferasa; consultar la Figura 15a. Se realizó el mismo experimento que el descrito en (a) con células objetivo NUGC-4 y células efectoras recogidas de cultivos tratados con ZA/IL-2 en diferentes puntos de tiempo; consultar la Figura 15b. El mismo experimento que se describe en (a) se realizó usando NUGC-4 como células objetivo; consultar la Figura 15c. Las células expandidas con ZA/IL-2 se usaron ya sea directamente o se purificaron células T V γ 9V δ 2 a partir de los cultivos utilizando clasificación MACS de TCR γ δ (Miltenyi Biotech). Se obtuvo una pureza de más del 97,0% de células T V γ 9V δ 2 en linfocitos.

35 Se observó una actividad fuerte de ADCC contra líneas celulares tumorales humanas positivas para CLDN18.2, pero no negativas para CLDN18.2 (Figura 15a). Además, no se obtuvo actividad de ADCC con anticuerpos de control de isotipo (no mostrados). En el transcurso del tratamiento con ZA/IL-2, la actividad lítica de ADCC aumenta con el tiempo para una fracción de donantes (Figura 15b). La curva dosis/efecto de IMAB362 se desplaza hacia arriba y hacia la izquierda mostrando valores de EC₅₀ mejorados y tasas máximas de lisis a lo largo del tiempo. En comparación con las PBMC no acondicionadas, las células T efectoras V γ 9V δ 2 enriquecidas por tratamiento con ZA/IL-2 son capaces de alcanzar una tasa máxima de muerte más alta de células objetivo positivas para CLDN18.2 ya que requieren menores concentraciones de IMAB362 para la misma tasa de muerte.

40 Para confirmar que las células T V γ 9V δ 2 son el reservorio para la actividad lítica, estas células se aislaron con una pureza > 97% mediante clasificación de células magnéticas de poblaciones de PBMC cultivadas con ZA/IL-2 el día 14. La actividad de ADCC junto con IMAB362 se conserva y se mejora parcialmente debido a su mayor pureza. Estos datos confirman que las células T V γ 9V δ 2 son las principales responsables de la actividad de ADCC observada con cultivos de PBMC de 14 días (Figura 15c).

Ejemplo 12 El tratamiento de líneas celulares objetivo con ZA/IL-2 no afecta la expresión superficial de CLDN18.2

50 Los modos de acción desencadenados con IMAB362 son estrictamente dependientes de la presencia y cantidad de CLDN18.2 extracelularmente detectable. Por lo tanto, la influencia del tratamiento con ZA/IL-2 sobre la densidad de superficie de CLDN18.2 se ha analizado por citometría de flujo utilizando líneas celulares NUGC-4 y KATO III que expresan CLDN18.2 endógeno. Específicamente, se realizó un análisis por citometría de flujo de la unión de IMAB362 sobre células de cáncer gástrico NUGC-4 impermeabilizadas tratadas previamente con ZA/IL-2 o ZA/IL-2 + EOF o ZA/IL-2 + 5-FU/OX durante 72 horas.

El tratamiento ZA/IL-2 *in vitro* no revela cambio en la cantidad de CLDN18.2 localizado en la superficie; consultar la

Figura 16.

Ejemplo 13: El aumento de ADCC mediada por IMAB362 por tratamiento con ZA/IL-2 de PBMC no se ve comprometido por el tratamiento previo con EOF

Los agentes quimioterapéuticos comprometen la proliferación celular. En contraste, el tratamiento con ZA/IL-2 desencadena la expansión de las células T V γ 9V δ 2. Para analizar las influencias de estas interacciones opuestas en células efectoras, se cultivaron PBMC de 6 donantes sanos con ZA/IL-2 o ZA/IL-2 + EOF durante 8 días antes de la aplicación en ensayos de ADCC (relación de E:T 15:1). Se determinaron las concentraciones de IMAB362 que daban como resultado una lisis mediada por ADCC del 50% de células objetivo NUGC-4 no tratadas (EC₅₀).

El aumento de ADCC inducida por IMAB362 de células NUGC-4 debido al tratamiento de PBMC con ZA/IL-2 no se altera significativamente mediante el tratamiento combinado de PBMC con EOF (Figura 17).

Ejemplo 14 Direccionamiento *in vivo* de IMAB362 a tumores positivos para CLDN18.2 y efectos antitumorales de IMAB362 sobre xenoinjertos de células tumorales humanas en ratones desnudos

Para investigar el direccionamiento a células tumorales *in vivo* de IMAB362, se administraron 80 μ g de anticuerpo marcado con Dyelight® 680 por vía intravenosa a ratones desnudos que fueron xenoinjertados subcutáneamente con la línea celular de cáncer gástrico humano NUGC-4. Las células NUGC-4 muestran expresión en la superficie de CLDN18.2 así como de HER2/neu (objetivo de trastuzumab), pero son negativas para CD20. Los estudios de control se realizaron inyectando grupos de ratones injertados con NUGC-4 ya sea con trastuzumab marcado con Dyelight 680 (grupo de control positivo) o con rituximab marcado con Dyelight® 680 (control negativo). IMAB362 se acumula fuerte y exclusivamente en los xenoinjertos tumorales, como se demostró mediante la formación de imágenes *in vivo* de ratones utilizando un sistema de formación de imágenes de fluorescencia Xenogen®, 24 horas después de la inyección iv de anticuerpos (Figura 18). IMAB362 es retenido eficientemente en el tumor objetivo positivo y detectable en una intensidad comparable incluso después de 120 horas (Figura 18). Trastuzumab también se detecta exclusivamente en los xenoinjertos 24 horas después de la inyección. La señal de trastuzumab se lava rápidamente dentro de las 120 horas después de la inyección. No se detecta ninguna señal con rituximab.

Además, se utilizó IMAB362 para tratar ratones desnudos que portaban tumores de xenoinjerto positivos para CLDN18.2. Se llevaron a cabo estudios de modelo de tratamiento temprano (con administraciones de IMAB362 tan pronto como 3 días después de la inoculación de células tumorales). Además, se iniciaron experimentos avanzados de tratamiento tumoral hasta 9 días después de la inoculación de células tumorales cuando los tumores habían alcanzado volúmenes de aproximadamente 60-120 mm³.

Se inocularon subcutáneamente ratones desnudos con 1x10⁷ transfectantes de HEK293-CLDN18.2. El tratamiento de 10 ratones por grupo comenzó 3 días después de la inoculación del tumor. Los ratones se trataron con 200 μ g de IMAB362, infliximab como control de isotipo y PBS dos veces por semana durante 6 semanas alternando las vías de aplicación intravenosa e intraperitoneal. Mientras que todos los ratones en los grupos tratados con PBS o control de isotipo murieron dentro de 70-80 días, los animales tratados con IMAB362 tuvieron un beneficio de supervivencia (Figura 19). No sólo se prolongó el tiempo de muerte, sino que 4 de 10 ratones sobrevivieron al período completo de observación de 210 días.

Se inició el tratamiento de 9 a 10 ratones por grupo cuando los volúmenes medios del tumor alcanzaron 88 mm³ (62-126 mm³). Antes del tratamiento, los ratones se estratificaron en grupos de ensayo para asegurar tamaños de tumor comparables en todos los grupos. Los ratones se trataron con 200 μ g de IMAB362, control de isotipo o PBS dos veces por semana durante 6 semanas alternando las vías de aplicación intravenosa e intraperitoneal. Todos los ratones en los grupos tratados con PBS o control de isotipo murieron dentro de 50-100 días. Los animales tratados con IMAB362 tuvieron un beneficio de supervivencia, con casi una duplicación del tiempo medio de supervivencia (47 frente a 25 días). Tres de estos ratones sobrevivieron a todo el período de observación (Figura 20). Es importante destacar que la eficacia antitumoral *in vivo* depende de la presencia del objetivo en las células tumorales. No se observaron efectos antitumorales del tratamiento con IMAB362 en ratones injertados con células tumorales HEK293 negativas para CLDN18.2.

El modelo de tumor gástrico NUGC-4 se usó para investigar la eficacia de IMAB362 frente a células cancerosas con expresión endógena de CLDN18.2. Las células NUGC-4 crecen agresivamente en ratones desnudos.

Se inyectaron por vía subcutánea 1x10⁷ células de cáncer gástrico NUGC-4 en el flanco izquierdo de ratones desnudos atímicos (n = 9 para el grupo de IMAB362; n = 8 para los grupos de control). Se aplicaron IMAB362 (200 μ g por inyección) y controles dos veces por semana vías de aplicación iv e ip, comenzando 6 días después de la inoculación del tumor con inyección iv. Los tamaños del tumor se controlaron dos veces por semana. Los datos presentados en la Figura 21a son la media con SEM. El crecimiento tumoral de ratones tratados con IMAB362 fue significativamente inhibido en comparación con ratones tratados con controles (*p < 0,05). La Figura 21b muestra volúmenes de tumores al

día 21 después de la inoculación del tumor. Los volúmenes de tumores de ratones tratados con IMAB362 fueron significativamente más pequeños que los tumores de ratones control (*p <0,05).

5 Cuando se inocularon 1×10^7 células tumorales en ratones, el tiempo medio de supervivencia de ratones no tratados no es mayor a 25 días. El tratamiento con IMAB362, cetuximab, trastuzumab o isotipo y controles de regulador se inició cuando los volúmenes del tumor alcanzaron un tamaño medio de aproximadamente 109 mm^3 ($63\text{-}135 \text{ mm}^3$). Los ratones se estratificaron dependiendo del tamaño en grupos de tratamiento (Figura 21). Se demostró que IMAB362 reduce significativamente la tasa de crecimiento tumoral. No se observó una reducción significativa del crecimiento tumoral en comparación con los controles de solución salina o anticuerpos para este modelo de tumor de crecimiento agresivo. El retraso en el crecimiento tumoral se asoció con un tiempo de supervivencia medio que no aumentó significativamente de ratones tratados con IMAB362 (31 días frente a 25 días).

10 Se examinó la actividad antitumoral de IMAB362 con dos modelos de xenoinjerto de carcinoma gástrico humano usando células NCI-N87 o NUGC-4 con transducción lentiviral de CLDN18.2 objetivo de IMAB362 (NCI-N87~CLDN18.2 y NUGC-4 ~ CLDN18.2).

15 Se inocularon tumores de xenoinjerto NCI-N87~CLDN18.2 por vía subcutánea mediante inyección de 1×10^7 células NCI-N87 ~ CLDN18.2 en el flanco de 8 ratones desnudos (hembras, 6 semanas de edad) por grupo de tratamiento. El tratamiento comenzó 5 días después de la inoculación del tumor mediante inyección intravenosa de $800 \mu\text{g}$ de IMAB362 o con $200 \mu\text{L}$ de NaCl al 0,9% para el grupo de control de solución salina. La administración intravenosa se continuó semanalmente durante todo el tiempo de observación. El tamaño del tumor y la salud del animal se controlaron cada dos semanas. La Figura 22a muestra los efectos del tratamiento con IMAB362 sobre el crecimiento tumoral. El tamaño de tumores sc se midió dos veces por semana (media + SEM, ***p <0,001). La Figura 22b muestra los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier. Los ratones se sacrificaron, cuando el tumor alcanzó un volumen de 1400 mm^3 .

20 De este modo, el tratamiento continuo con IMAB362 inhibió el crecimiento tumoral altamente significativo (p <0,001) de xenoinjertos de carcinoma gástrico NCI-N87~CLDN18.2 (Figura 22a). El retraso en el crecimiento tumoral se asoció con un tiempo de supervivencia significativamente mayor (p <0,05) de ratones tratados con IMAB362 (Figura 22b).

25 La inmunoterapia con IMAB362 de xenoinjertos NUGC-4~CLDN18.2 de crecimiento rápido produjo tamaños de tumor significativamente más pequeños (p <0,05) el día 14 del tratamiento. Después de las primeras dos semanas de tratamiento con IMAB362, la progresión tumoral de NUGC-4~CLDN18.2 fue muy agresiva. Sin embargo, la inhibición del crecimiento del tumor NUGC-4~CLDN18.2 hasta el día 14 del tratamiento dio como resultado una supervivencia significativamente mayor (p <0,05) de los ratones tratados con IMAB362.

30 En resumen, el IMAB362 era altamente efectivo en el tratamiento de xenoinjertos de carcinoma gástrico que mostraban un retardo significativo de la progresión tumoral y una supervivencia prolongada en modelos endógenos de tumores positivos para CLDN18.2. En los sistemas de modelos tumorales muy agresivos, estos efectos antitumorales de IMAB362 son menos prominentes, pero no obstante significativos, haciendo hincapié en la fuerte capacidad antitumoral de IMAB362.

35 Ejemplo 15 Efectos antitumorales de IMAB362 combinado con quimioterapia en modelos de tumores de ratón

In vitro, la ADCC mediado por IMAB362 es más eficiente en células de cáncer gástrico humano tratadas previamente con combinaciones de agentes quimioterapéuticos que incluyen EOF y 5-FU + OX. Por lo tanto, el impacto antitumoral de la combinación de estos compuestos con IMAB362 se investigó *in vivo* en modelos de tumor de ratón.

40 Se inocularon tumores de xenoinjerto de NCI-N87~CLDN18.2 por inyección de 1×10^7 células de NCI-N87~CLDN18.2 subcutáneas en el flanco de 9 ratones para cada grupo de tratamiento. Los ratones portadores de tumores se trataron según el régimen de EOF con $1,25 \text{ mg/kg}$ de epirrubicina, $3,25 \text{ mg/kg}$ de oxaliplatino y $56,25 \text{ mg/kg}$ de 5-fluorouracilo en forma intraperitoneal los días 4, 11, 18 y 25 después de la inoculación del tumor, seguido de inyección intravenosa de $800 \mu\text{g}$ de IMAB362 24 horas después de la administración de la quimioterapia. El tratamiento con IMAB362 se continuó semanalmente. El tamaño del tumor y la salud del animal se controló cada dos semanas. La Figura 23a muestra los efectos del tratamiento combinado sobre el crecimiento tumoral.

45 El tamaño de tumores sc se midió dos veces por semana (media + SEM; *p <0,05). La Figura 23b muestra gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier. Los ratones se sacrificaron, cuando el tumor alcanzó un volumen de 1400 mm^3 .

50 Los ratones desnudos portadores de tumores NCI-N87~CLDN18.2 tratados con el régimen IMAB362 o EOF mostraron un crecimiento tumoral suprimido altamente significativo en comparación con los ratones de control. El tratamiento adicional con IMAB362 en combinación con quimioterapia de EOF dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral significativamente mayor (p <0,05) que el tratamiento con régimen de EOF solamente (Figura 23a). La supervivencia media de ratones en el grupo de control salino fue de 59 días. El tratamiento con IMAB362 semanalmente de ratones prolongó significativamente la supervivencia media a 76 días similar a la supervivencia de ratones en el

grupo de EOF con una supervivencia media de 76 días también. Sin embargo, el tratamiento combinado con IMAB362 y EOF aumentó la supervivencia media a 81 días (Figura 23b).

Los tumores de xenoinjerto se inocularon por inyección de 1×10^7 células de NUGC-4-CLDN18.2 subcutáneas en el flanco de 10 ratones desnudos (hembras, seis semanas de edad) por grupo de tratamiento. Los ratones se trataron el día 3, 10, 17 y 24 con agentes quimioterapéuticos. El tratamiento con IMAB362 se continuó semanalmente. La Figura 24a muestra curvas de crecimiento tumoral de xenoinjertos NUGC-4 ~ CLDN18.2 en forma sc (media + SEM). La Figura 24b muestra los gráficos de supervivencia de Kaplan-Meier (Prueba de intervalo logarítmico (Mantel-Cox), $**p < 0,01$).

Los tumores de xenoinjerto subcutáneos de NUGC-4~ CLDN18.2 crecieron muy agresivamente. Sin embargo, el tratamiento con IMAB362 de ratones desnudos portadores de tumores inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control tratado con solución salina. En la terapia combinada con EOF, los efectos de IMAB362 sobre el crecimiento del tumor NUGC-4~CLDN18.2 se enmascararon por inhibición del crecimiento debido al tratamiento con EOF, que no mostró mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con EOF solo (Figura 24a). Sin embargo, la supervivencia media de los ratones tratados con el régimen de IMAB362 y EOF se prolongó en forma muy significativa ($p < 0,01$), en comparación con la supervivencia de los ratones tratados con EOF solamente (Figura 24b).

Ejemplo 16: Las células T V γ 9V δ 2 expandidas con ZA/IL-2 mejoran el control mediado por IMAB362 de tumores avanzados *in vivo*

Para investigar la actividad combinada de células T $\gamma\delta$ generadas por IMAB362 y ZA/IL-2 en sistemas de ratón, se recurrió a ratones NSG. Los ratones NSG carecen de células T maduras, células B, células asesinas naturales (NK), múltiples vías de señalización de citoquinas, y tienen muchos defectos en la inmunidad innata, mientras que los nichos en los tejidos inmunológicos primarios y secundarios son permisivos a la colonización por células inmunes humanas.

Los ratones NSG se inocularon subcutáneamente con 1×10^7 células HEK293 transfectadas con CLDN18.2. El mismo día, los ratones recibieron 8×10^6 PBMC humanas enriquecidas por células T V γ 9V δ 2, que se cultivaron durante 14 días en medio complementado con ZA. Además, se inyectaron ratones con 50 μ g/kg de ZA y 5000 U de IL-2 (Proleukin). Para mantener las células T humanas funcionales, se administró IL-2 cada dos semanas y ZA semanalmente. Cuando los tumores HEK293-CLDN18.2 se volvieron macroscópicamente visibles, se inició un tratamiento cada dos semanas con 200 μ g de IMAB362. Además de 9 ratones tratados como se ha descrito, se establecieron dos grupos de ratones de control. Un grupo no recibió células T $\gamma\delta$ humanas, el otro grupo se trató con un anticuerpo control de isotipo en lugar de IMAB362. El crecimiento de los tumores positivos para CLDN18.2 en ratones tratados con IMAB362 en presencia de células T $\gamma\delta$ humanas y ZA fue significativamente inhibido y casi anulado, mientras que en ratones tratados con un anticuerpo control de isotipo o sin efectores de células T humanas, los tumores crecieron agresivamente y los ratones tuvieron que ser sacrificados prematuramente (Figura 25).

Ejemplo 17 Efectos antitumorales de IMAB362 combinado con quimioterapia en modelos de tumores de ratón

Se examinó la actividad antitumoral de IMAB362 en combinación con quimioterapia en aloinjertos de carcinoma gástrico subcutáneo en ratones NMRI exogámicos inmunocompetentes usando células CLS-103 con transducción lentiviral de *cldn18.2* murino (CLS-103 ~ *cldn18.2*).

Se inocularon tumores de aloinjerto de CLS-103 ~ *cldn18.2* por inyección de 1×10^6 células de CLS-103- *cldn18.2* subcutáneas en el flanco de 10 ratones NMRI para cada grupo de tratamiento. Los ratones portadores de tumor fueron tratados con 1,25 mg/kg de epirrubicina, 3,25 mg/kg de oxaliplatino y 56,25 mg/kg de 5-fluorouracilo (EOF) en forma intraperitoneal los días 3, 10, 17 y 24 después de la inoculación del tumor, seguido por inyección intravenosa de 800 μ g de IMAB362 24 horas después de cada administración de quimioterapia. La IL-2 se administró cada dos semanas por inyección subcutánea de 3.000 IE. Después del final de la quimioterapia, el tratamiento con IMAB362 e IL-2 se continuó durante todo el período de observación. El tamaño del tumor y la salud del animal se controlaron cada dos semanas. Los ratones se sacrificaron, cuando el tumor alcanzó un volumen de 1.400 mm³ o los tumores se tomaron ulcerosos.

Como puede observarse en la Figura 26, los ratones NMRI portadores de tumor CLS-103~*cldn18.2* tratados con IMAB362 o EOF solamente no mostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con el grupo de control salino. Por el contrario, la combinación de la quimioterapia EOF y el tratamiento con IMAB362 dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral significativamente mayor y en la supervivencia prolongada de ratones portadores de tumores. Estas observaciones indican la existencia de efectos terapéuticos aditivos o incluso sinérgicos por combinación de quimioterapia con EOF e inmunoterapia con IMAB362. El tratamiento con IL-2 no mostró ningún efecto sobre el crecimiento tumoral.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

ES 2 637 416 T3

<120> Terapia de combinación que involucra anticuerpos contra claudina 18.2 para el tratamiento del cáncer

<130> 342-71 PCT

<150> PCT/EP2012/002210

<151> 2012-05-23

5 <160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 261

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20           25

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35           40           45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50           55           60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65           70           75           80

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

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 100          105          110

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

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val
 130          135          140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly
 145          150          155          160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165          170          175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180          185          190
    
```

ES 2 637 416 T3

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 637 416 T3

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe
 165 170 175
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met
 180 185 190
 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala
 195 200 205
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser
 245 250 255
 Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 3

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
 1 5 10

<210> 4

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
 1 5 10

15 <210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 637 416 T3

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile
1 5 10

<210> 8

15 <211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala
1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser
20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala
35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

20 <210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 637 416 T3

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys
1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr
1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe
20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 11

10 <211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 637 416 T3

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 12

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

ES 2 637 416 T3

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> 13

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 13

ES 2 637 416 T3

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

ES 2 637 416 T3

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
20 25 30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

ES 2 637 416 T3

Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
130 135 140

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
145 150 155 160

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
165 170 175

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
180 185 190

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
210 215 220

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
305 310 315 320

ES 2 637 416 T3

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 15

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 15

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80 85 90

ES 2 637 416 T3

340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
 465

<210> 16

<211> 465

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 16

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

ES 2 637 416 T3

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

ES 2 637 416 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 17

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 17

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly

ES 2 637 416 T3

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

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
 85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 100 105 110

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140

ES 2 637 416 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

ES 2 637 416 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

Gly Lys
465

<210> 19

<211> 469

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 19

ES 2 637 416 T3

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
 35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
 50 55 60

Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

Gly Glu Lys Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser
 85 90 95

Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

ES 2 637 416 T3

165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

ES 2 637 416 T3

435

440

445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 20

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 20

ES 2 637 416 T3

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 21

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 637 416 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 21

```

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1          5          10

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20        25

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
35        40        45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
50        55        60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65        70        75        80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85        90        95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100       105

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115      120      125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130     135     140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145     150     155     160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165     170     175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180     185     190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195     200     205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210     215     220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225     230     235

```

5

<210> 22

ES 2 637 416 T3

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 22

```

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

```

ES 2 637 416 T3

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 23

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 23

ES 2 637 416 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 24

<211> 240

5 <212> PRT

ES 2 637 416 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 24

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

5

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

ES 2 637 416 T3

<210> 25

<211> 239

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 25

```

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

```


ES 2 637 416 T3

```

145             150             155             160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
               165              170
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
               180              185              190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
              195              200              205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
              210              215              220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
              225              230              235

```

<210> 26

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 26

ES 2 637 416 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
 100 105 110

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

<210> 27

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 637 416 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 27

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
 165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
 195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
 210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235 240

5 <210> 28

<211> 234

ES 2 637 416 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

5 <400> 28

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15

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

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 100 105 110

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 29

<211> 117

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 val Thr val ser Ala

115

10

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

ES 2 637 416 T3

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

10

ES 2 637 416 T3

50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 32

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

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

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn 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 Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

10

ES 2 637 416 T3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

15 <400> 34

ES 2 637 416 T3

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

5 <210> 35

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 35

ES 2 637 416 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys

<210> 36

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 36

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

10

ES 2 637 416 T3

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 Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

10 <210> 38

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 637 416 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 38

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys

5 <210> 39

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 39

ES 2 637 416 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 40

5 <211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

10 <400> 40

ES 2 637 416 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 41

10

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

ES 2 637 416 T3

50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln
 85 90 95
Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 42

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

<400> 42

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

10 <210> 43

<211> 107

ES 2 637 416 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto de la PCR

5 <400> 43

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

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 44

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr
 1 5 10 15

15 <210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Epítopo

ES 2 637 416 T3

<400> 45

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 46

10

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 47

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys
1 5 10 15

20 <210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Epítopo

<400> 48

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

ES 2 637 416 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

5 <400> 49

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 50

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly
1 5 10 15

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo en combinación con un agente, en donde
 - 5 (a) el anticuerpo se une a CLDN18.2 y media la muerte de células que expresan CLDN18.2 por ADCC y/o CDC, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39, y
 - 10 (b) el agente es un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, dicho agente se selecciona del grupo que consiste en (i) oxaliplatino y 5-fluorouracilo, (ii) epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo; (iii) 5-fluorouracilo, ácido folínico y oxaliplatino, (iv) irinotecano, (v) docetaxel y (vi) cisplatino, y profármacos de los mismos.
2. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24.
- 15 3. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el método comprende además administrar un agente estimulante de células T $\gamma\delta$, en donde dicho agente es un bisfosfonato o un agente seleccionado del grupo que consiste en ácido zoledrónico, ácido clodrónico, ácido ibandrónico, ácido pamidrónico, ácido risedrónico, ácido minodrónico, ácido olupadrónico, ácido alendrónico, ácido incadrónico y sales de los mismos.
4. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 3, en donde las células T $\gamma\delta$ son células T V γ 9V δ 2.
- 20 5. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 3 o 4, en donde el bisfosfonato es un bisfosfonato que contiene nitrógeno (aminobisfosfonato).
6. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el agente que estimula las células T $\gamma\delta$ se administra en combinación con interleuquina 2.
7. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende administrar el anticuerpo a una dosis de hasta 1.000 mg/m².
- 25 8. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende administrar el anticuerpo repetidamente a una dosis de 300 a 600 mg/m².
9. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el cáncer es positivo para CLDN18.2.
10. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer es un adenocarcinoma, en particular un adenocarcinoma avanzado.
- 30 11. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer del estómago, cáncer del esófago, en particular el esófago inferior, cáncer de la unión eso-gástrica y cáncer gastroesofágico.
12. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el paciente es un paciente negativo para HER2/neu o un paciente con estado positivo para HER2/neu, pero no elegible para la terapia con trastuzumab.
- 35 13. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde CLDN18.2 tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.
14. Una preparación médica que comprende un anticuerpo y un agente, en donde
 - 40 (a) el anticuerpo se une a CLDN18.2 y media la muerte de células que expresan CLDN18.2 mediante ADCC y/o CDC, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39, y
 - (b) el agente es un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, siendo dicho agente seleccionado del grupo que consiste en (i) oxaliplatino y 5-fluorouracilo, (ii) epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo; (iii) 5-fluorouracilo, ácido folínico y oxaliplatino, (iv) irinotecano, (v) docetaxel y (vi) cisplatino y sus profármacos.

15. La preparación médica de la reivindicación 14, en donde la cadena pesada de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 y la cadena ligera de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24.
- 5 16. La preparación médica de la reivindicación 14 o 15, que comprende además un agente que estimula células T $\gamma\delta$, en donde dicho agente es un bisfosfonato o un agente seleccionado del grupo que consiste en ácido zoledrónico, ácido clodrónico, ácido ibandrónico, ácido pamidrónico, ácido risedrónico, ácido minodrónico, ácido olupadrónico, ácido alendrónico, ácido incadrónico y sales de los mismos.
- 10 17. La preparación médica de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que es un kit que comprende un primer recipiente que incluye el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 y un recipiente que incluye el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, y opcionalmente un recipiente que incluye el agente estimulante de células T $\gamma\delta$.
18. La preparación médica de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que incluye además instrucciones impresas para uso de la preparación para tratamiento del cáncer.

Figura 1

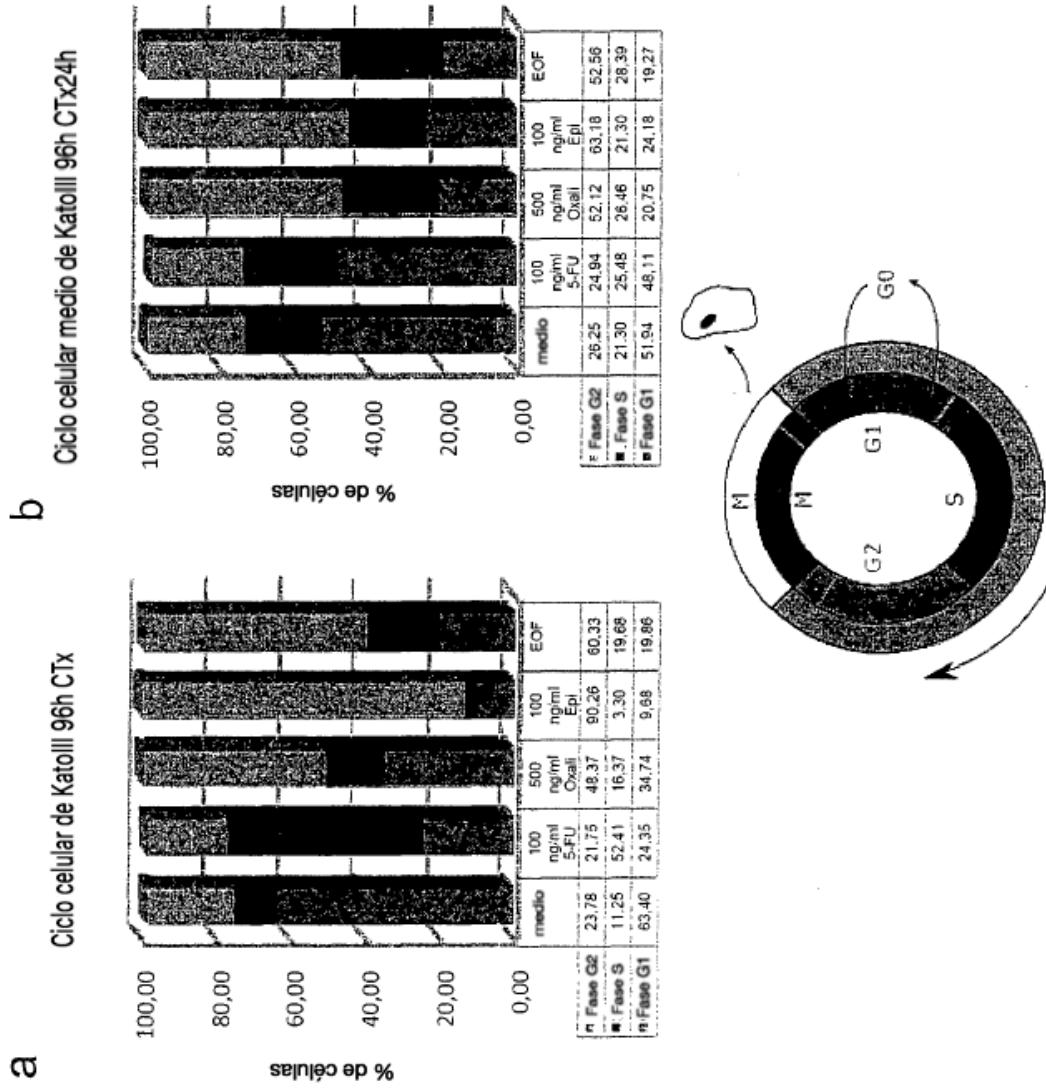


Figura 1

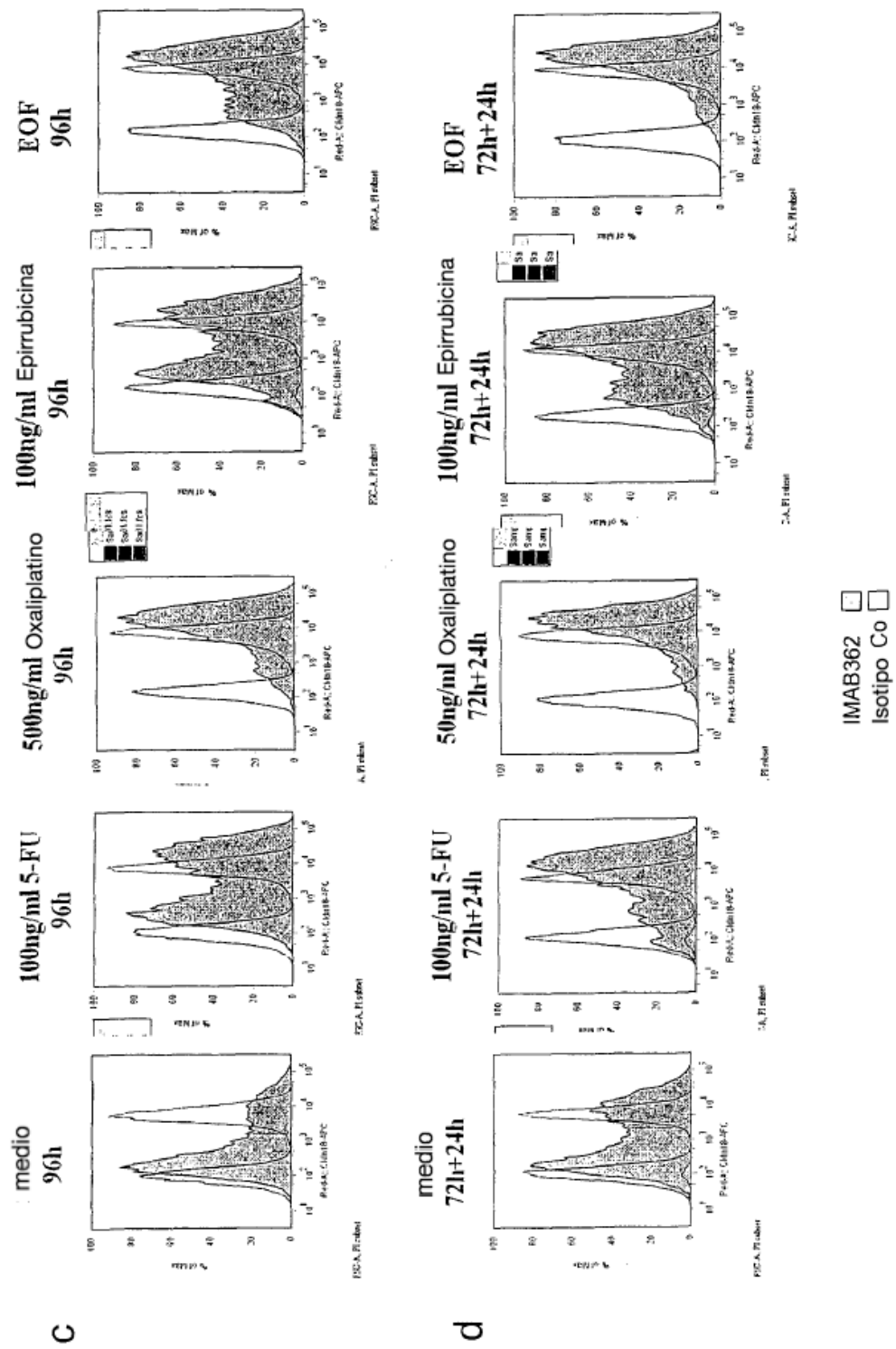


Figura 2

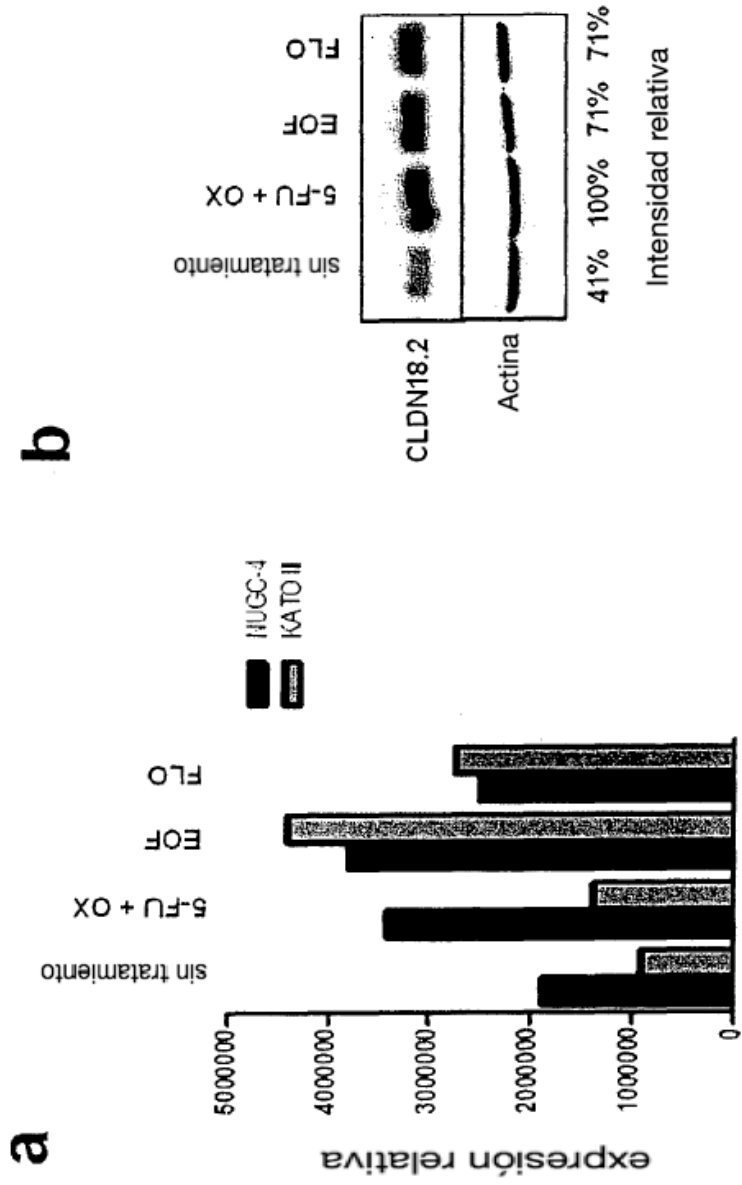


Figura 2

C

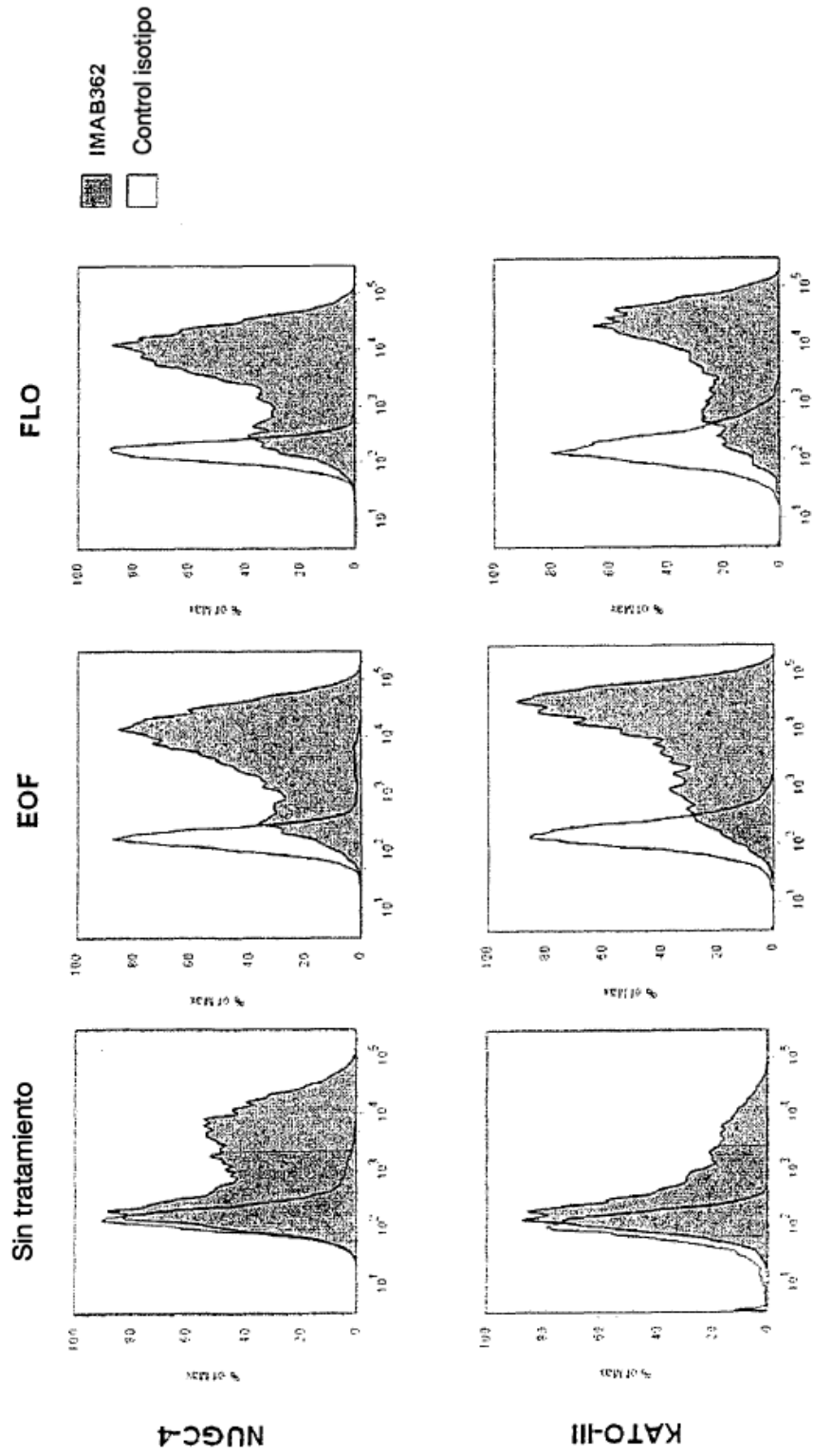


Figura 3

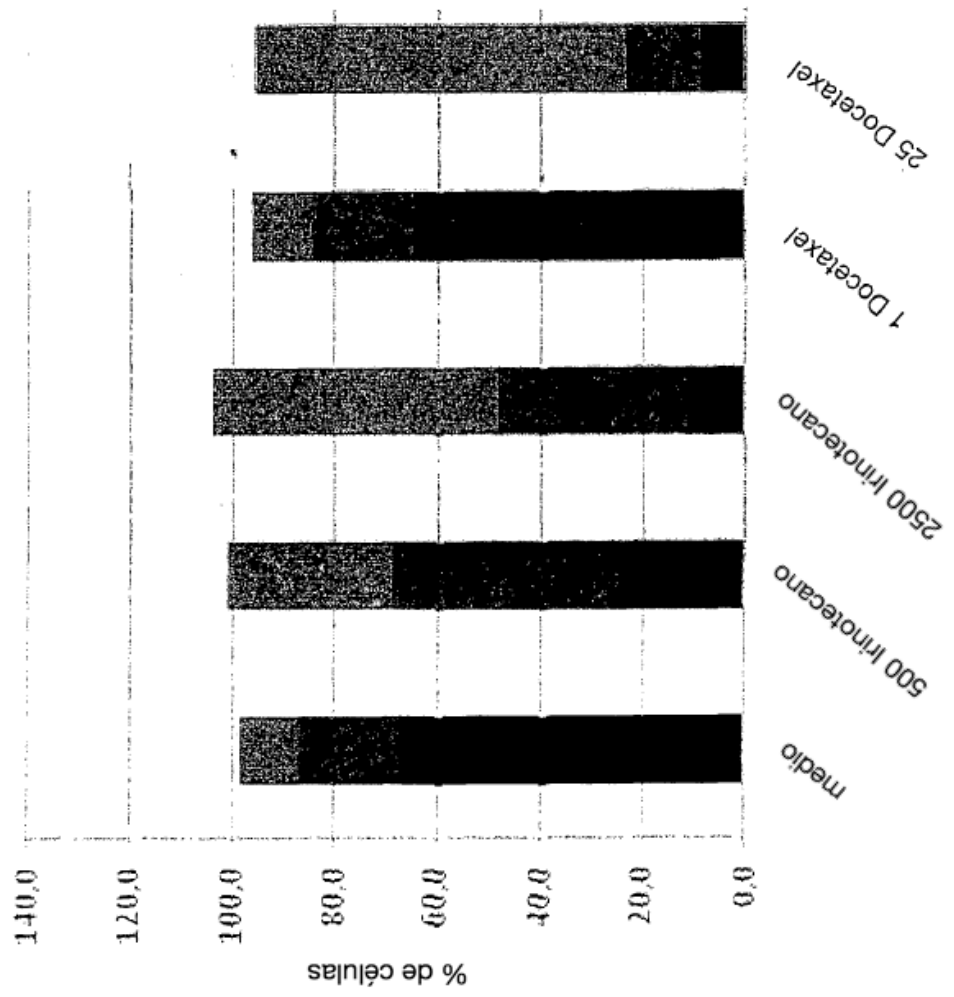


Figura 4

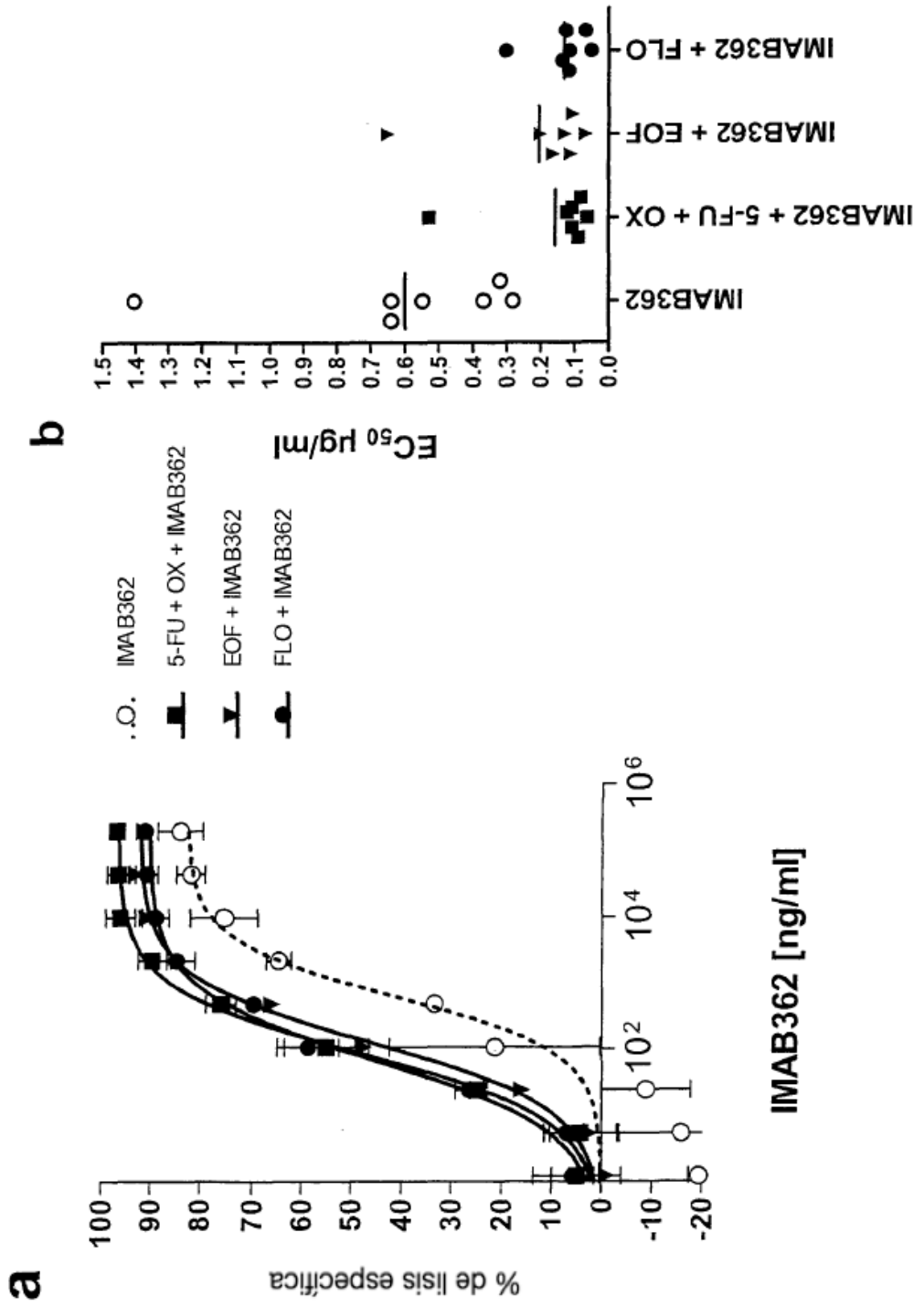


Figura 5

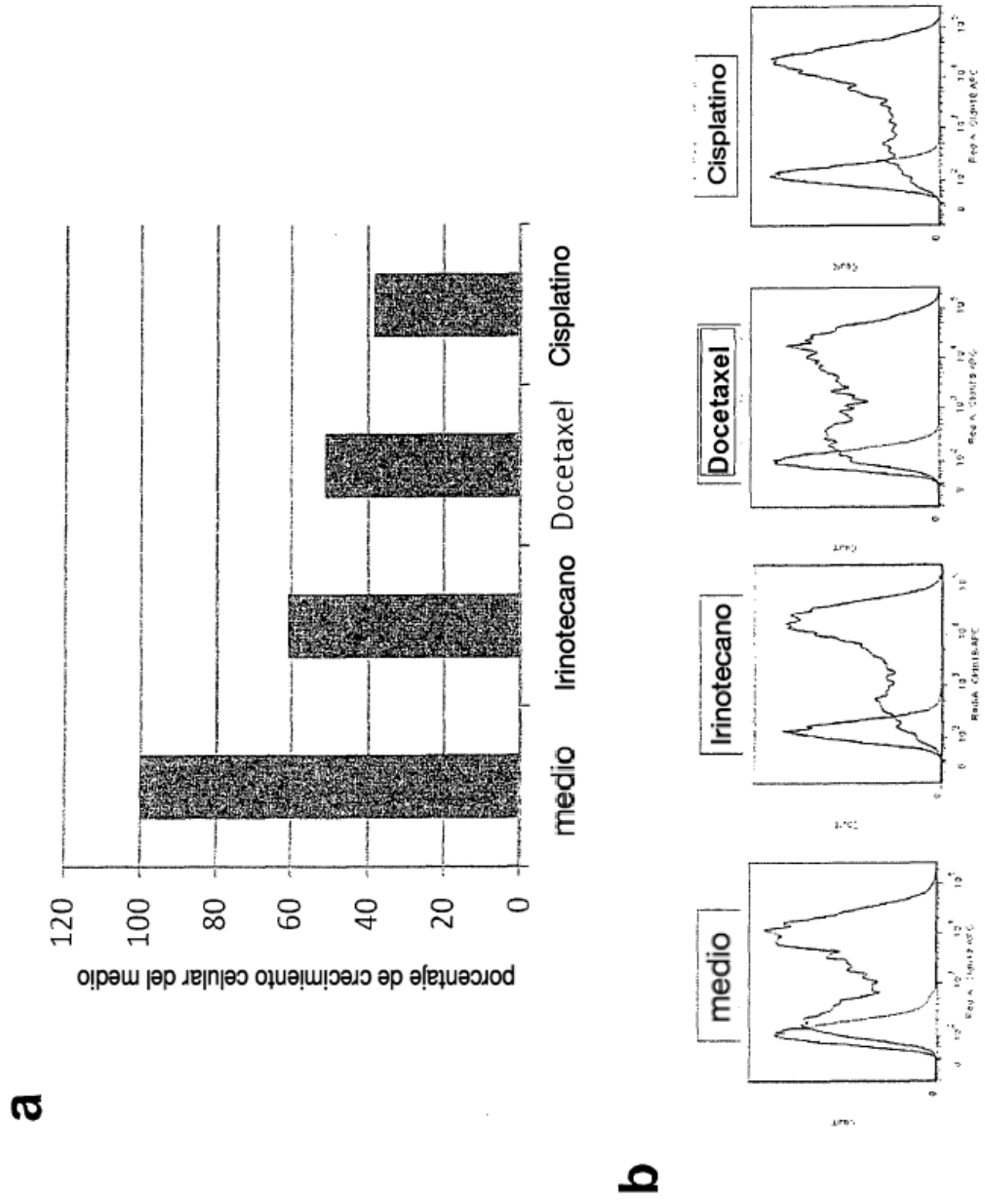


Figura 5

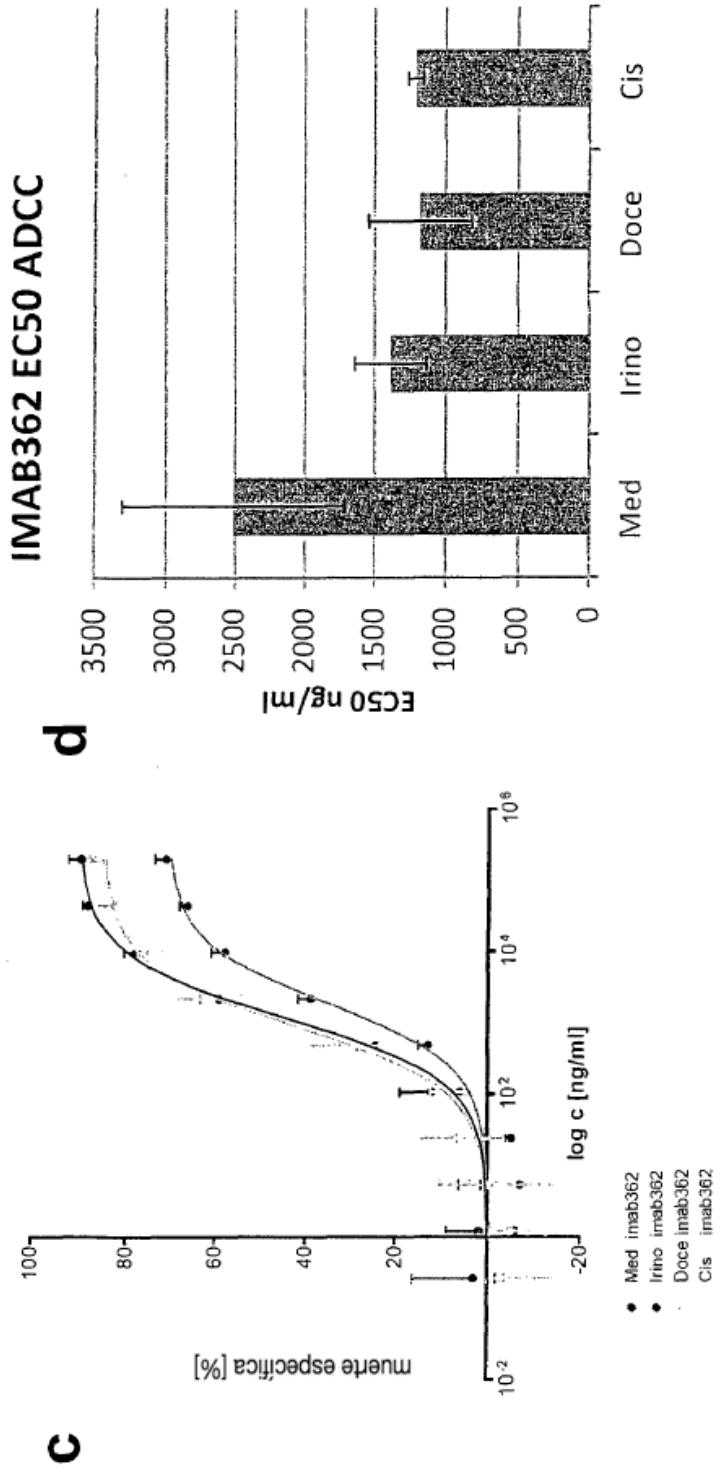


Figura 6

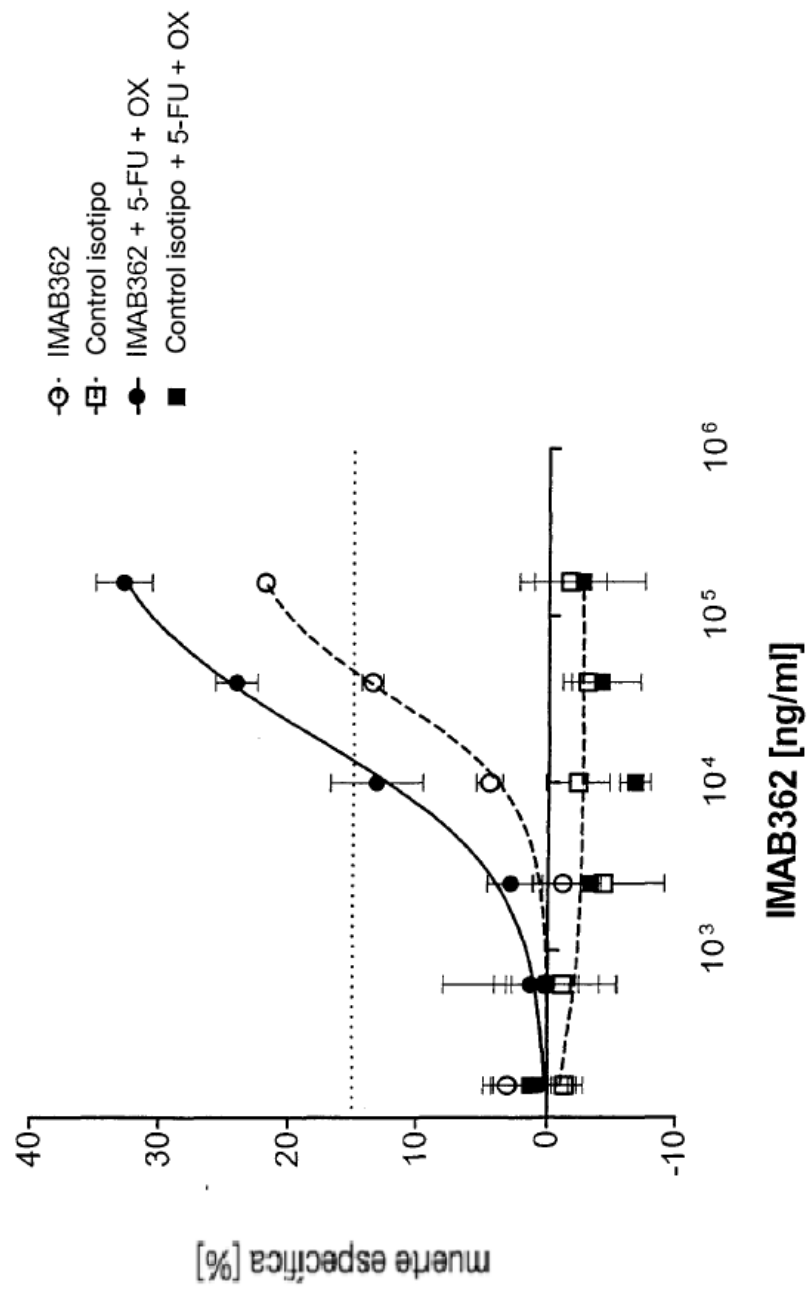


Figura 7

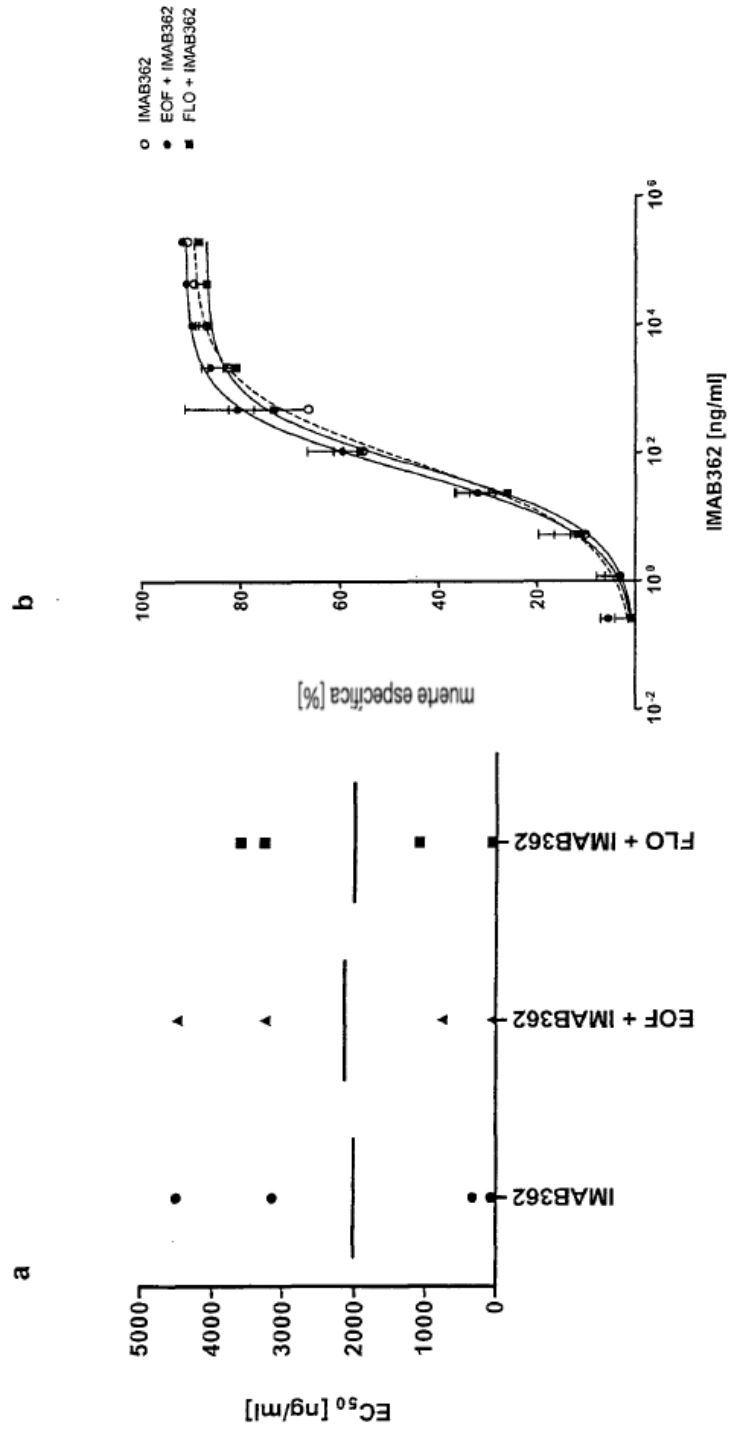


Figura 8

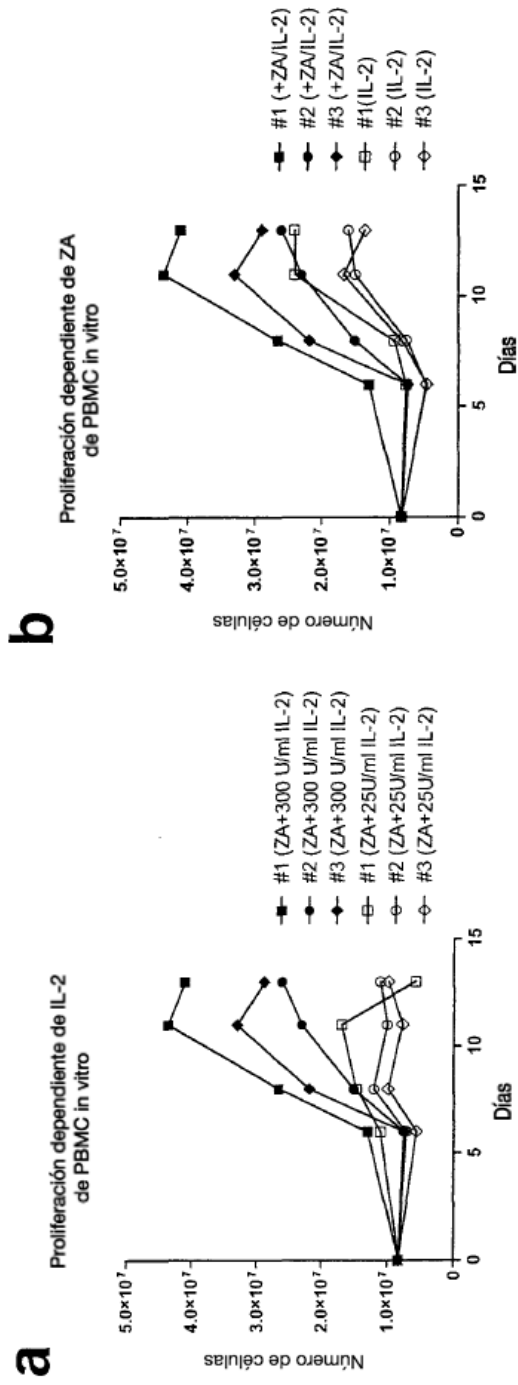


Figura 9

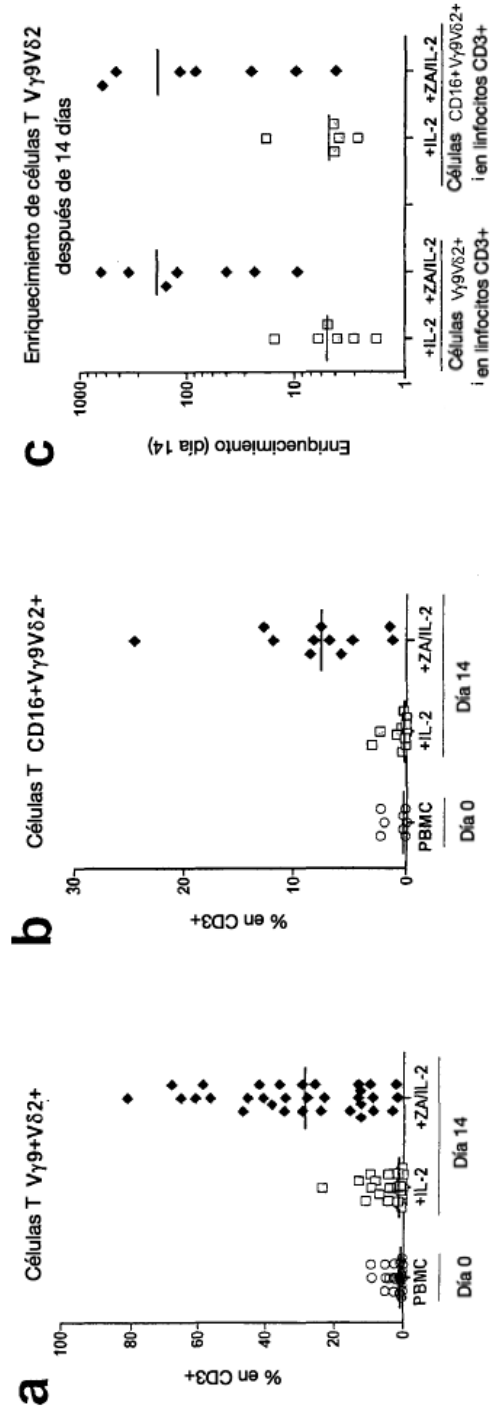


Figura 10

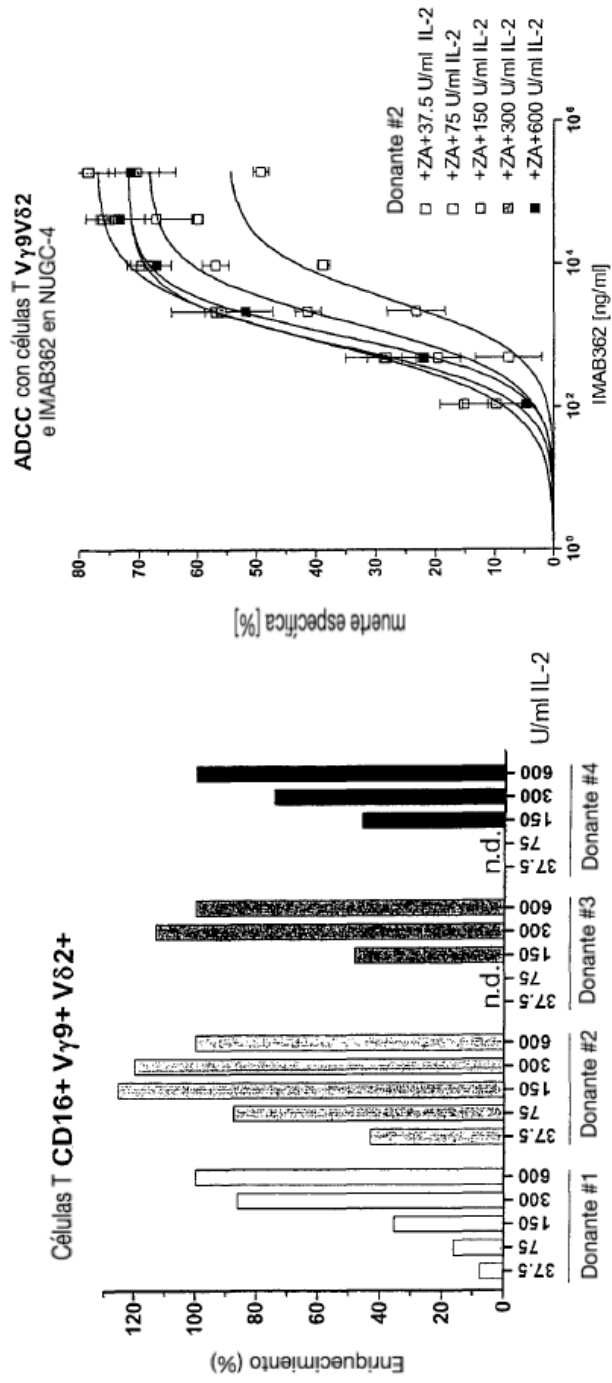


Figura 11

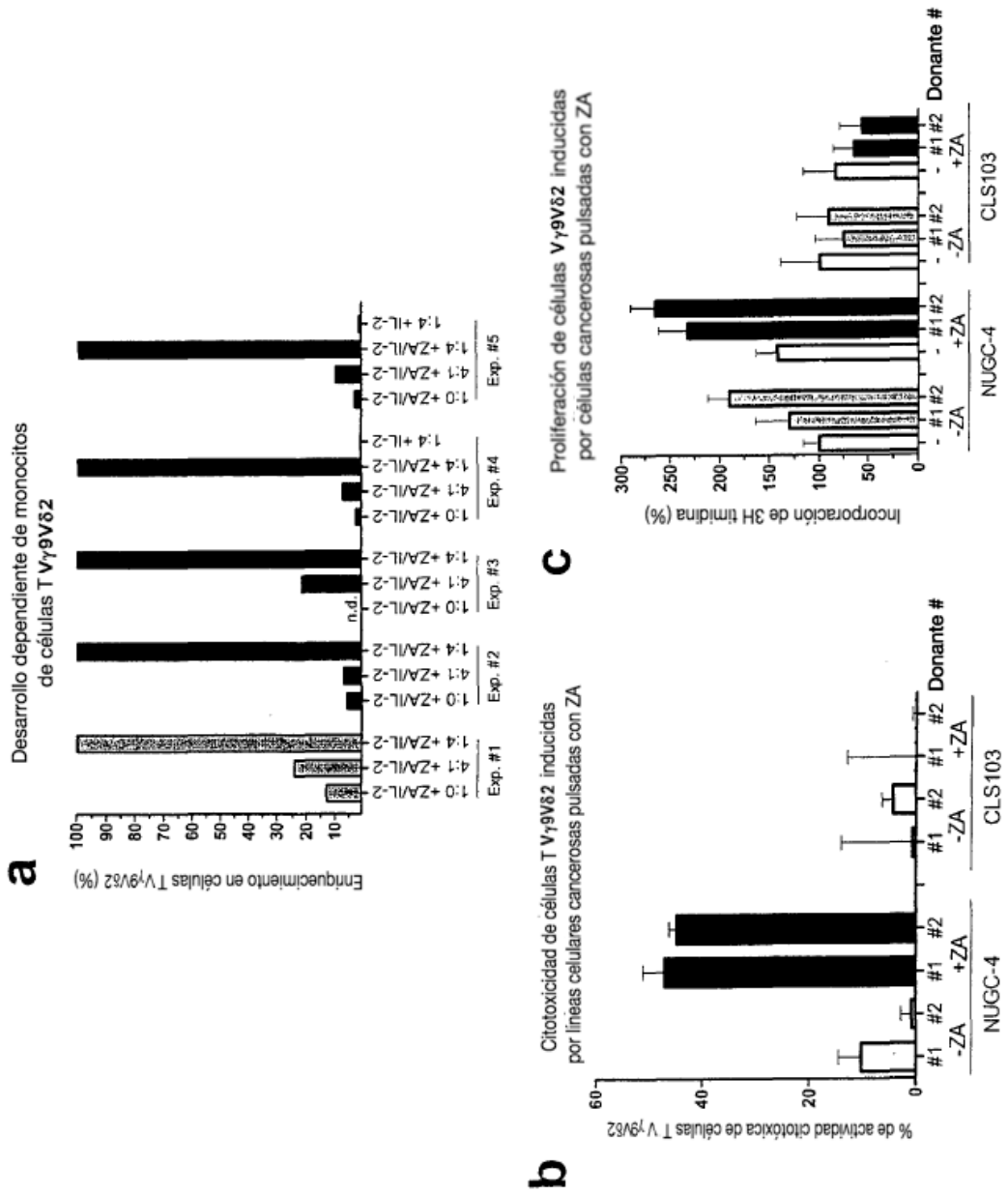


Figura 12

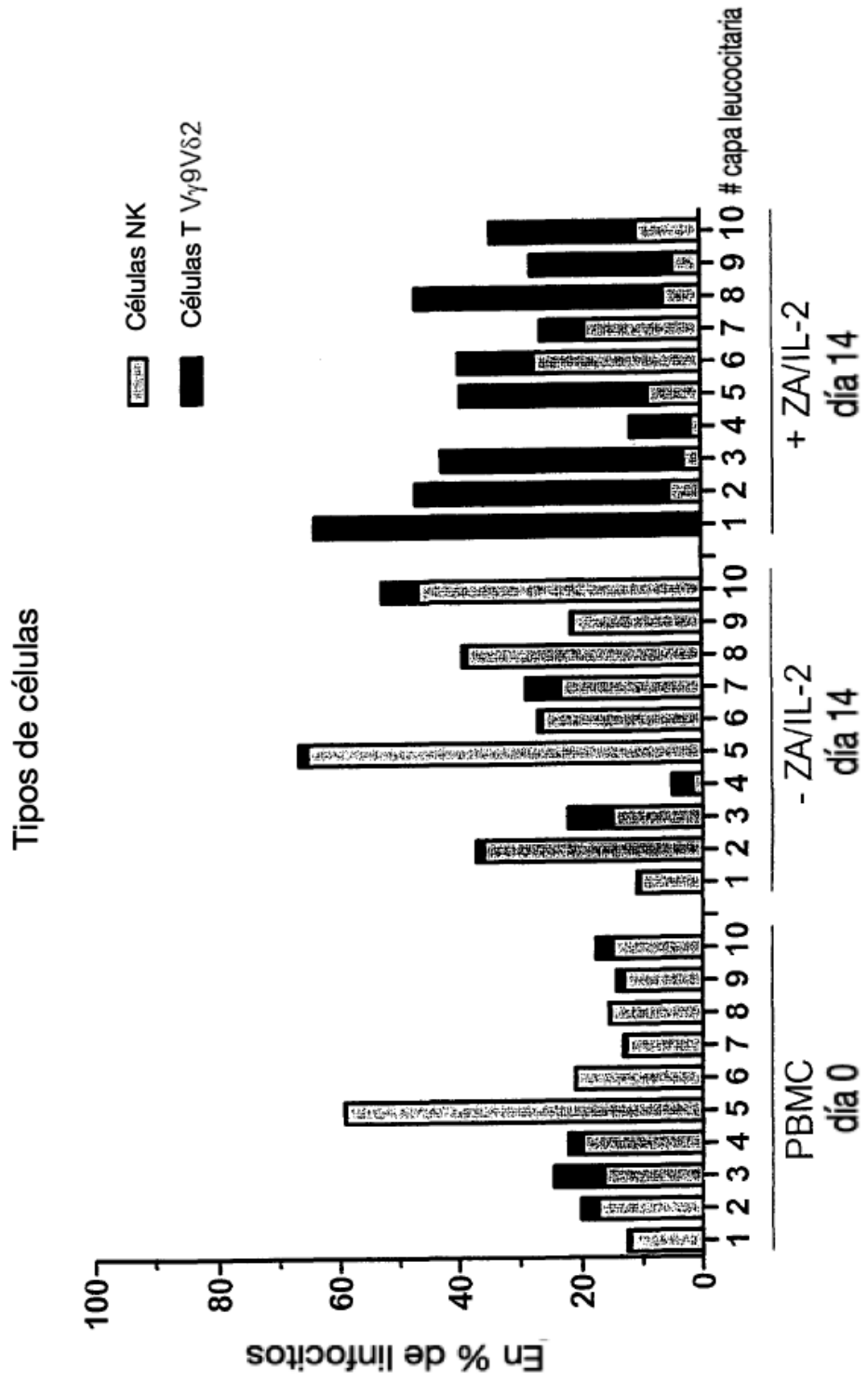


Figura 13

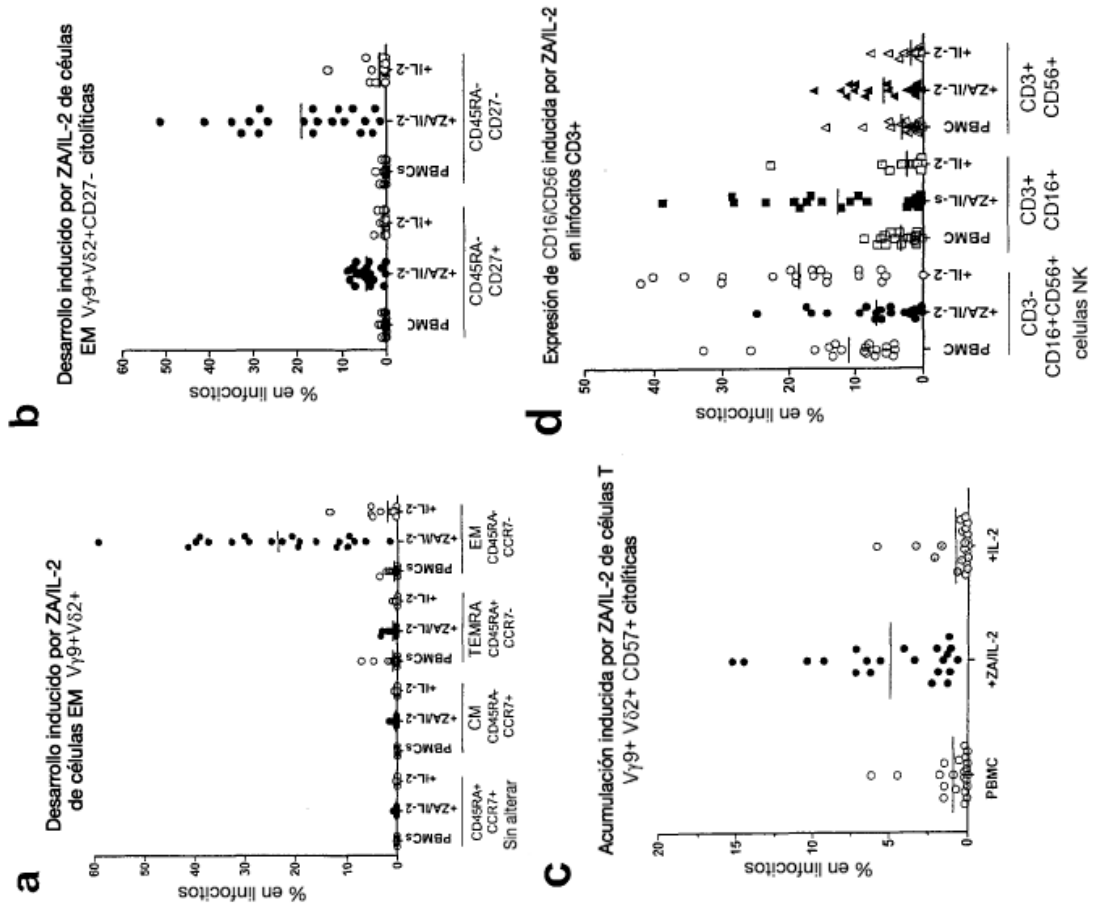


Figura 14

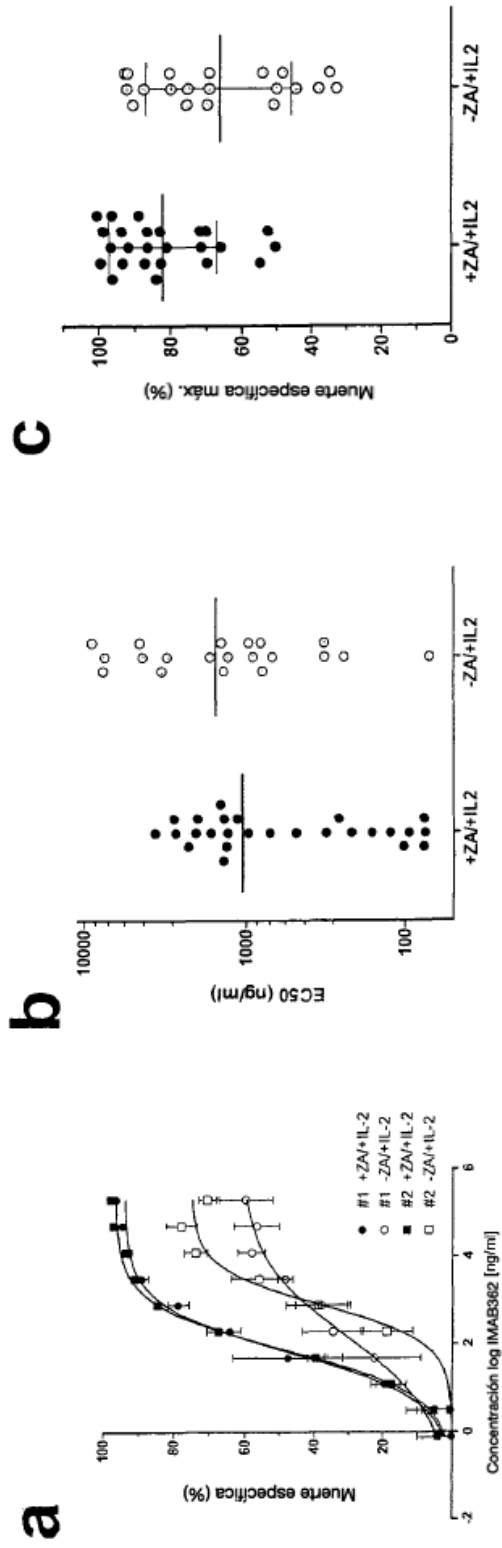


Figura 15

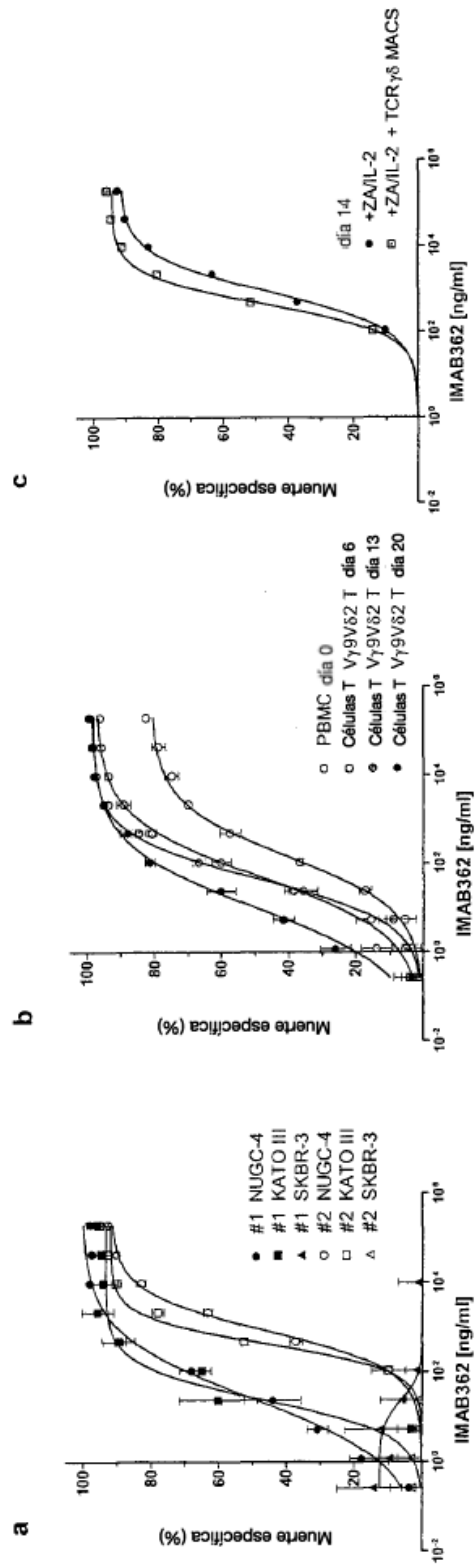
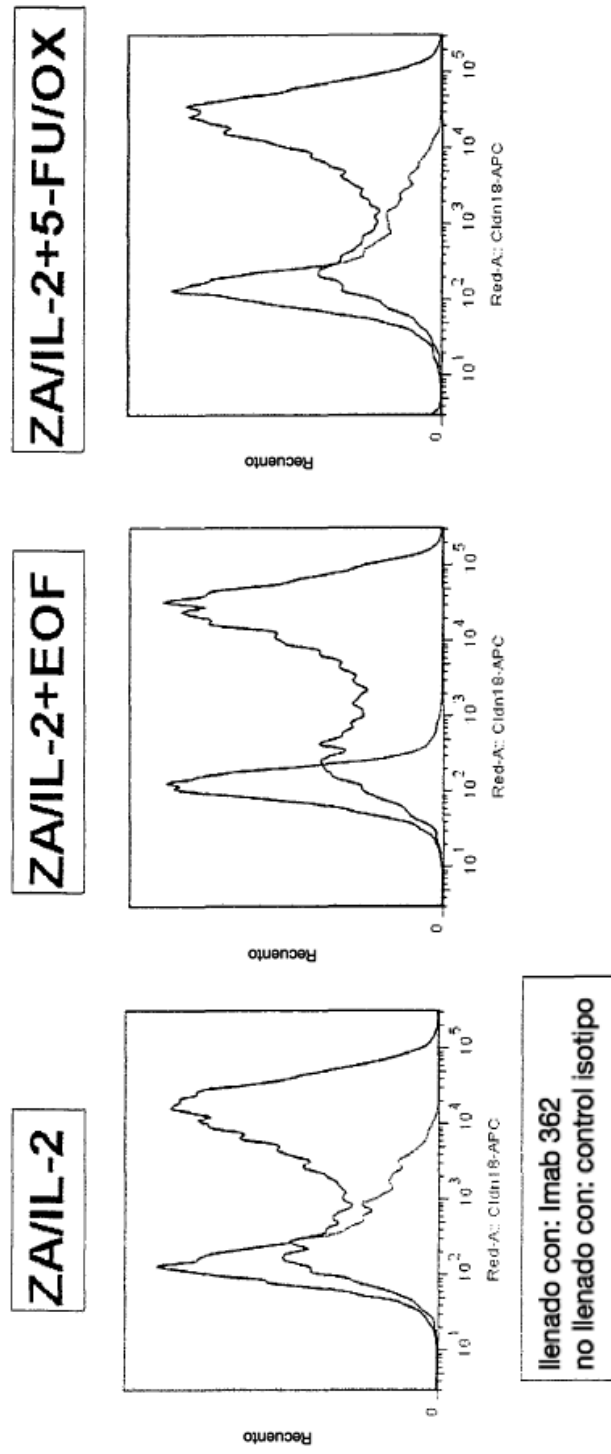


Figura 16



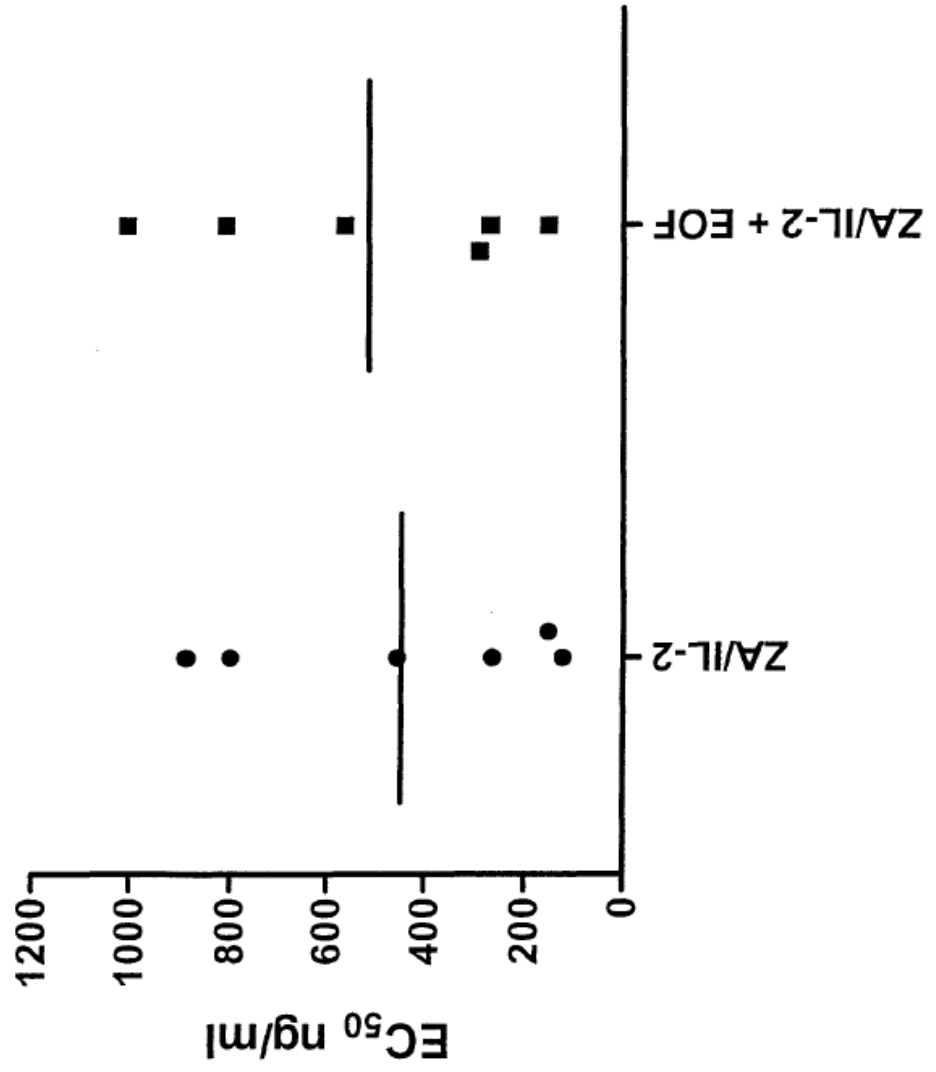
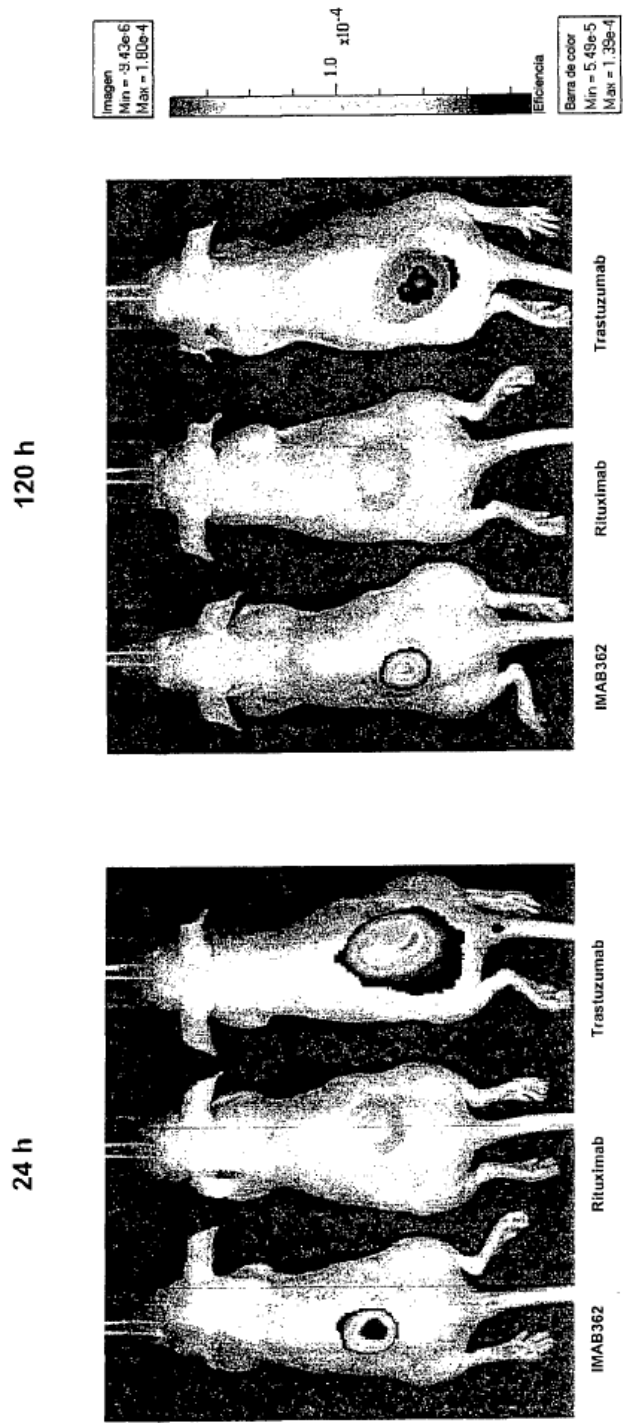


Figura 17

Figura 18



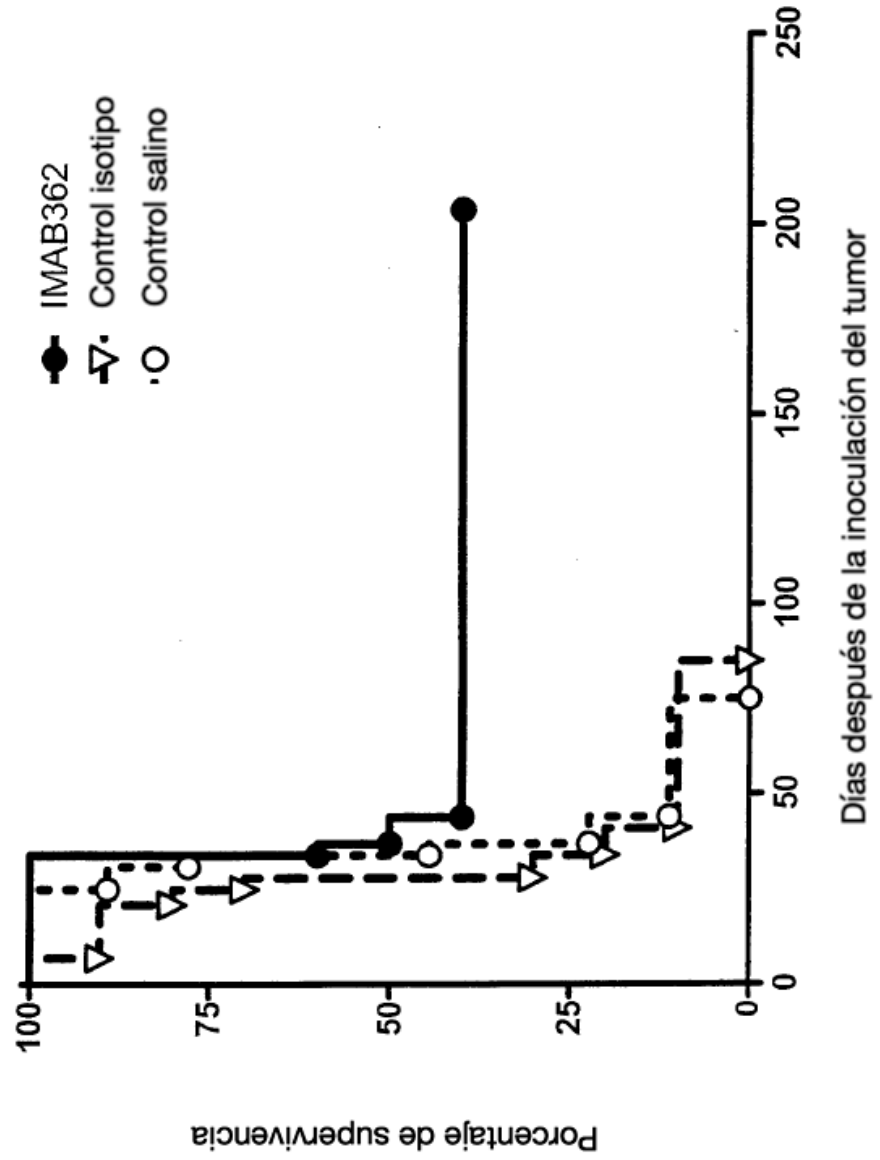


Figura 19

Figura 20

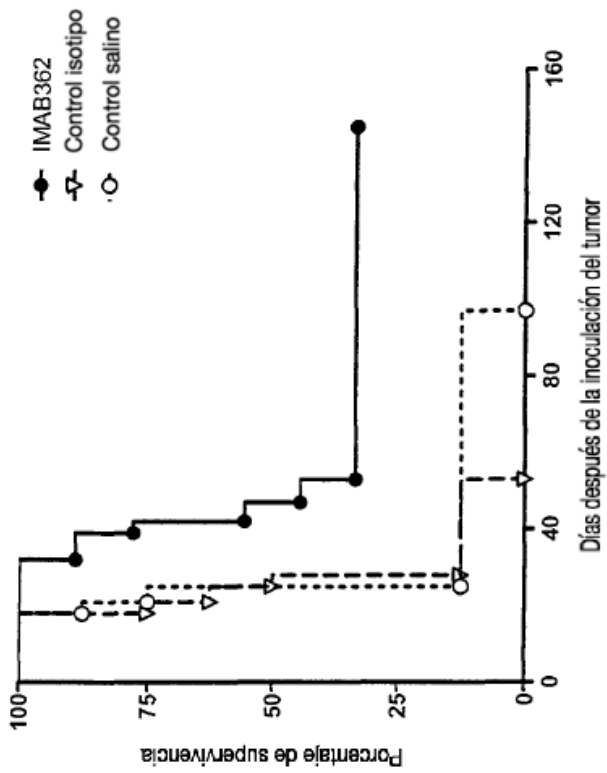
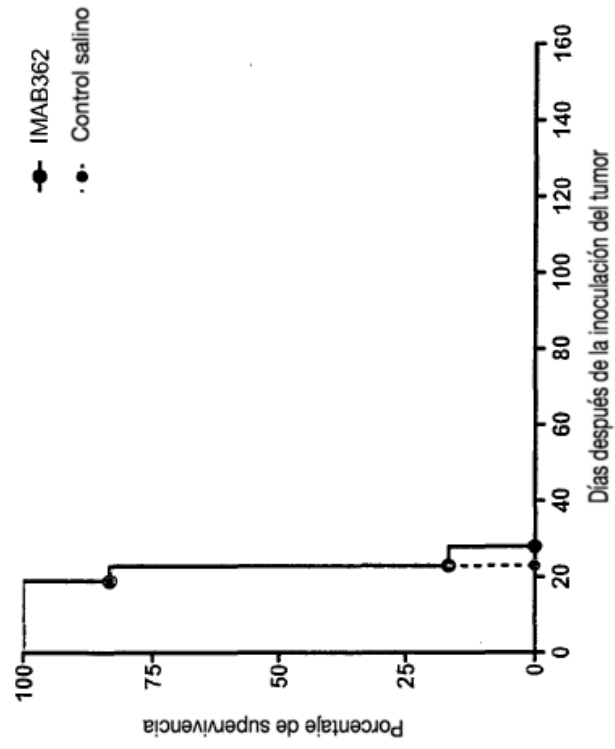


Figura 21

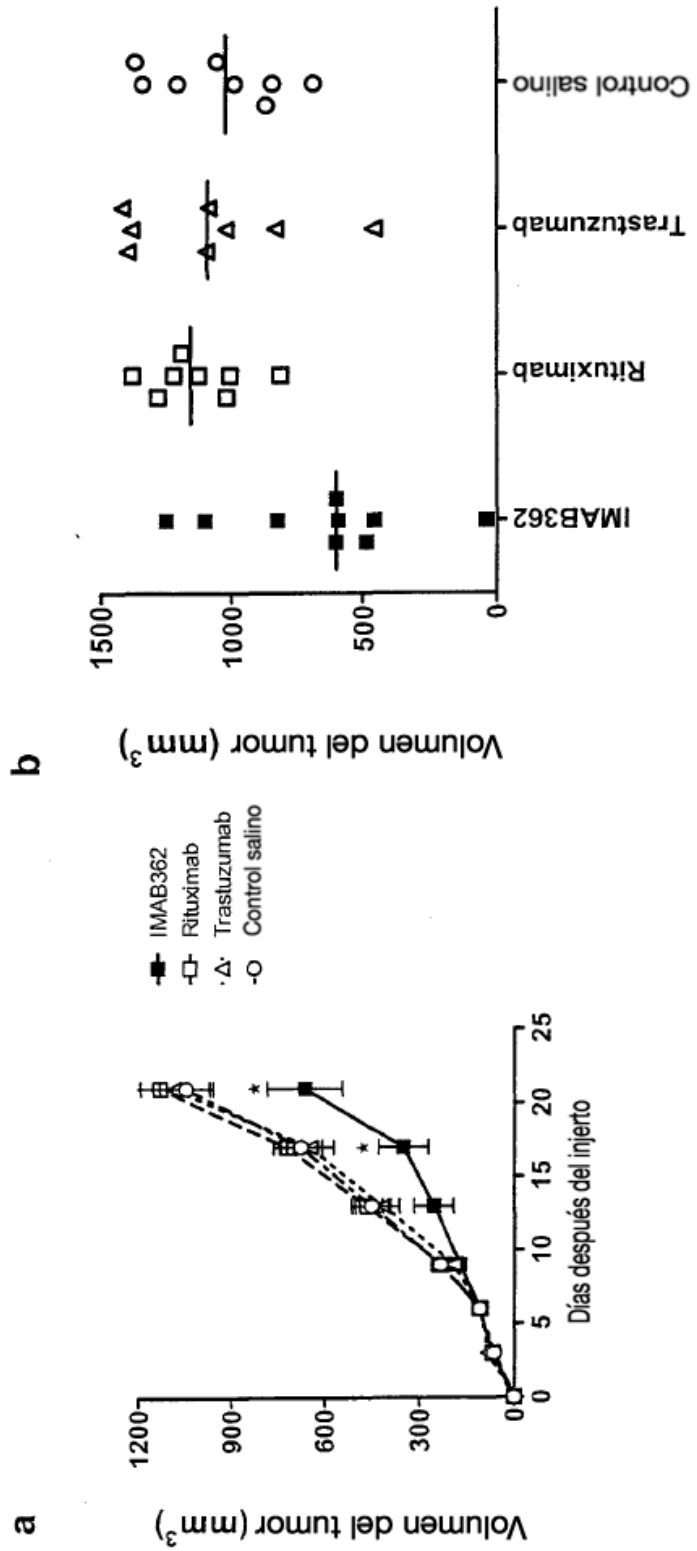


Figura 22

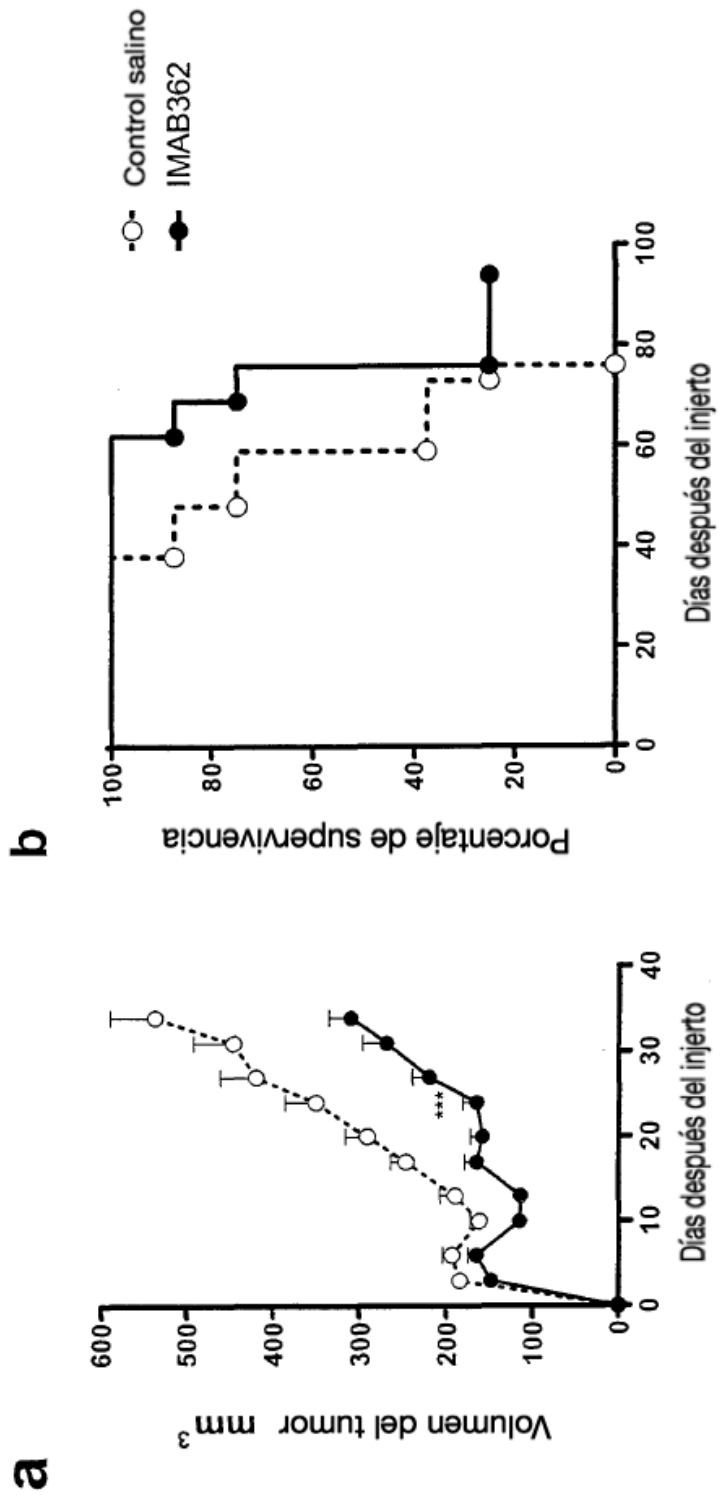


Figura 23

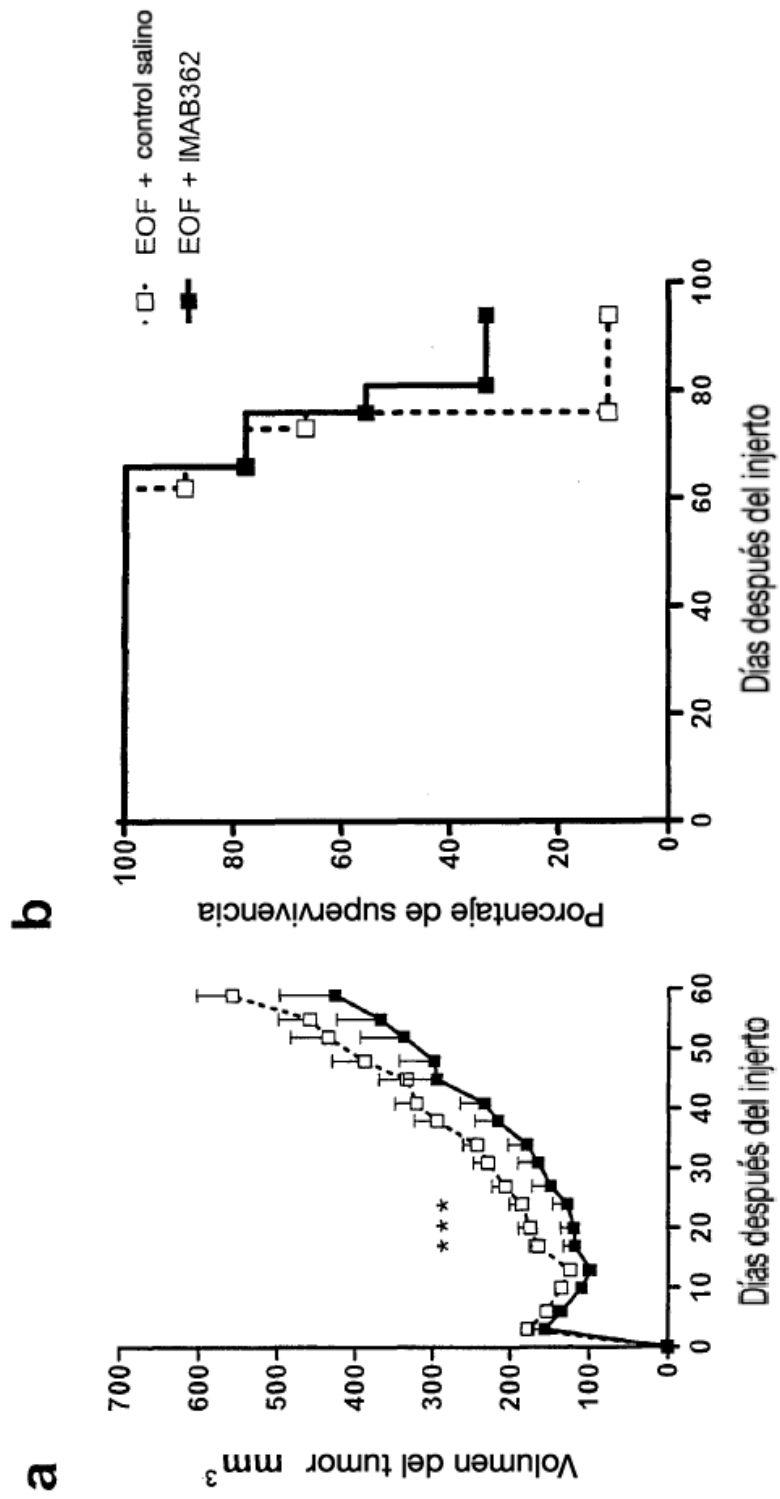


Figura 24

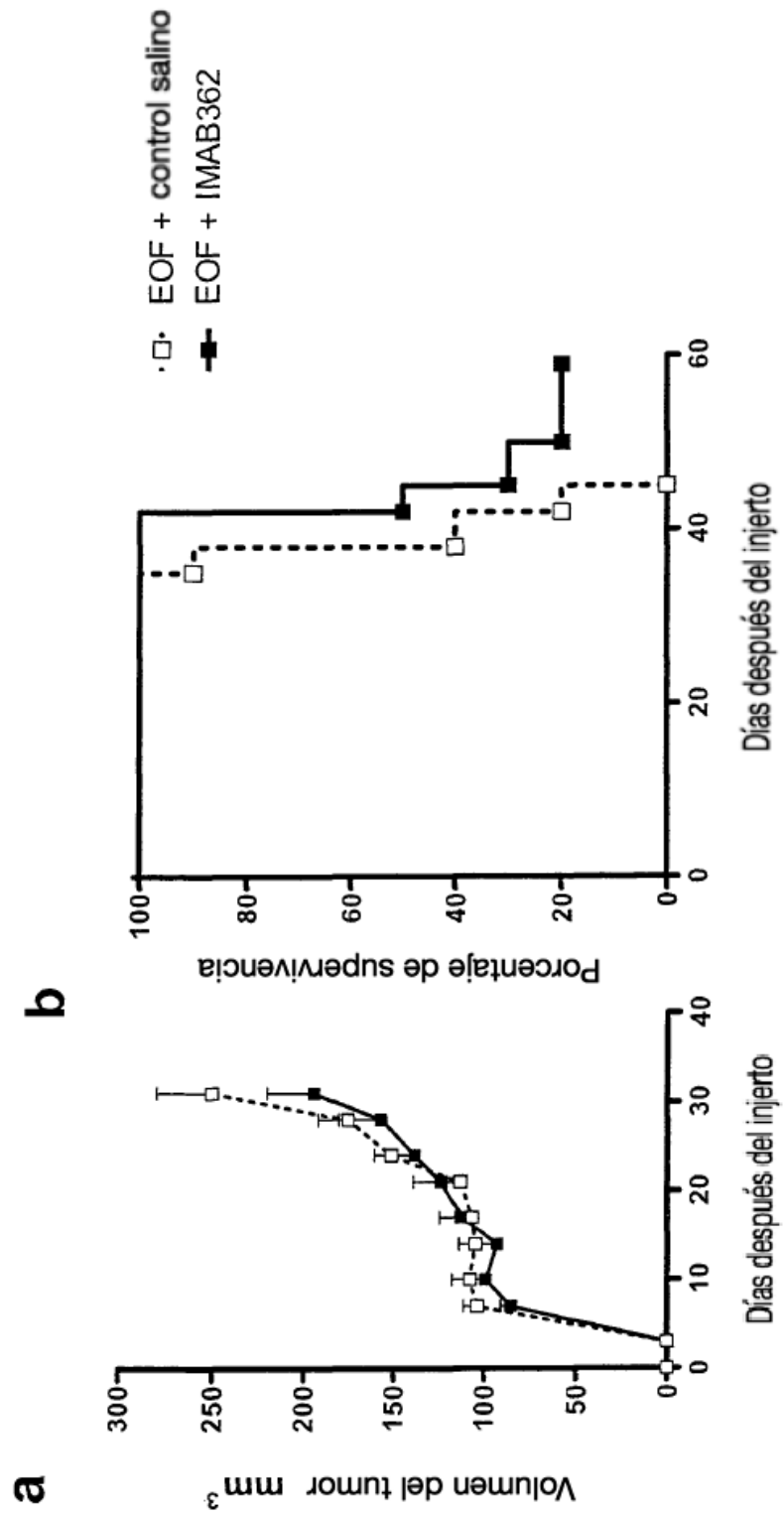


Figura 25

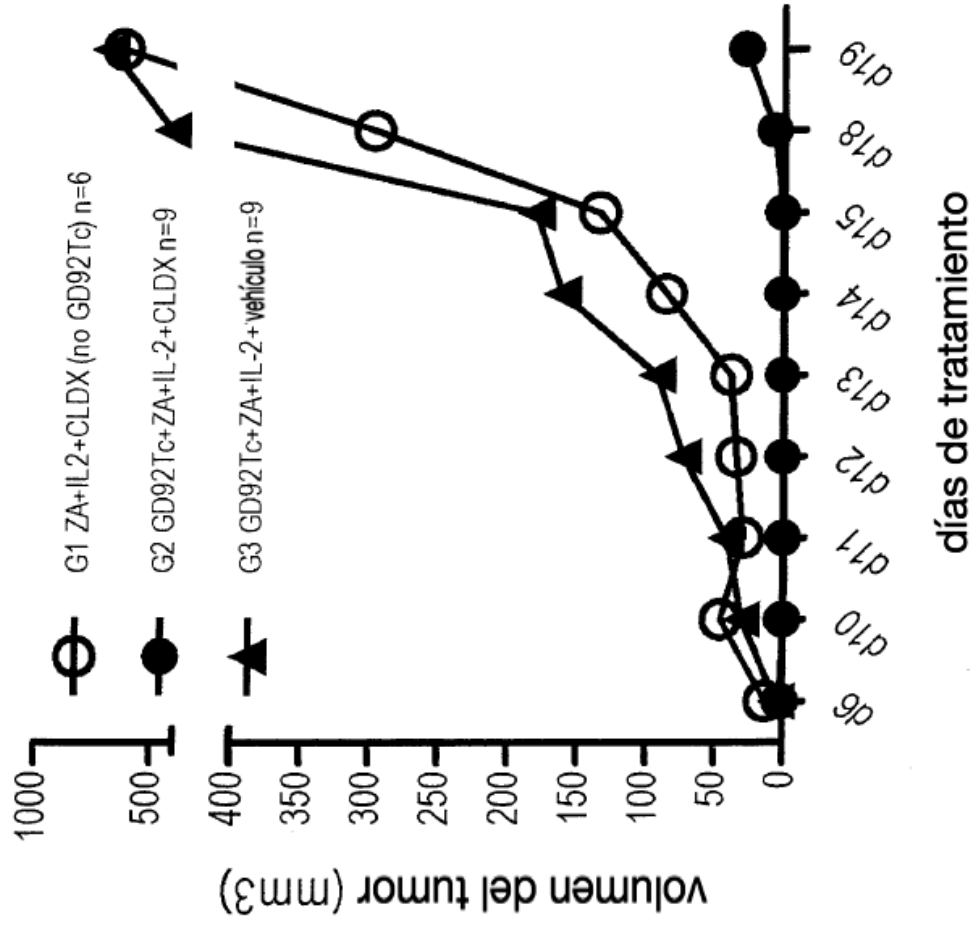


Figura 26

