

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 389**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2010 PCT/EP2010/006888**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11057788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 10778877 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2499161**

54 Título: **Anticuerpos específicos para claudina 6 (CLDN6)**

30 Prioridad:

11.11.2009 EP 09014136

11.11.2009 US 260202 P

06.07.2010 EP 10006956

06.07.2010 US 361618 P

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

11.01.2018

73 Titular/es:

GANYMED PHARMACEUTICALS GMBH (50.0%)

An der Goldgrube 12

55131 Mainz, DE y

JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ (50.0%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;

TÜRECI, ÖZLEM;

KOSLOWSKI, MICHAEL;

WALTER, KORDEN;

WÖLL, STEFAN;

KREUZBERG, MARIA;

HUBNER, BERND y

ERDELJAN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 649 389 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

Anticuerpos específicos para claudina 6 (CLDN6)

5 Los anticuerpos se han introducido con éxito en la clínica para su uso en la terapia del cáncer y en la última década, se han convertido en la terapéutica más prometedora en la oncología. Las terapias basadas en anticuerpos para el cáncer tienen el potencial de una mayor especificidad y un perfil de efectos secundarios inferior en comparación con los fármacos convencionales. La razón es una distinción precisa entre las células normales y neoplásicas por anticuerpos y el hecho de que su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, tales como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunes citotóxicas.

15 Las claudinas son proteínas integrales de membrana localizadas dentro de las uniones estrechas de los epitelios y endotelios. Se predice que las claudinas tienen cuatro segmentos transmembrana con dos bucles extracelulares y terminales N y C ubicados en el citoplasma. La familia de proteínas transmembrana claudina (CLDN) desempeña un papel crítico en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y pueden desempeñar, además, un papel en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular. La expresión diferencial de estas proteínas entre las células tumorales y normales, además, de su localización en la membrana, las convierte en objetivos atractivos para la inmunoterapia contra el cáncer y el uso de la terapéutica basada en anticuerpos para orientar las CLDN en la terapia contra el cáncer promete un alto nivel de especificidad terapéutica.

20 Sin embargo, la aplicación clínica de la terapéutica dirigida a CLDN enfrenta varios obstáculos. La expresión omnipresente de las CLDN en el cuerpo y el papel crítico de las CLDN en el mantenimiento de las uniones estrechas requiere especificidad de objetivo de la terapéutica dirigida a CLDN para maximizar la especificidad del tratamiento y minimizar la toxicidad sistémica.

25 El documento núm. WO 2009/087978 se refiere a los anticuerpos anti-CLDN6 y a su uso como agentes anticancerígenos. En particular, se describen los anticuerpos monoclonales designados AB3-1, AE1-16, AE49-11 y AE3-20. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos fue específico para CLDN6 como se muestra por análisis FACS en el Ejemplo 5. El anticuerpo AE3-20 reaccionó con CLDN9, mientras que los anticuerpos AE1-16 y AE49-11 mostraron una reactividad considerable con CLDN9 y reaccionaron, además, con CLDN4. La unión del anticuerpo AB3-1 a CLDN6 fue tan fuerte como su unión a CLDN9. Se describe en el Ejemplo 7 que el anticuerpo AE49-11 cuando se administró a un modelo tumoral de ratón inhibió el crecimiento tumoral y tuvo un efecto de prolongación de la vida. Sin embargo, dada la inespecificidad del anticuerpo usado, no queda claro si los efectos descritos se deben a la unión del anticuerpo a CLDN6.

35 Así, hasta ahora, no se ha descrito ningún anticuerpo específico a CLDN6 que se una selectivamente a la superficie de las células que expresan la CLDN6. Sin embargo, tal anticuerpo específico puede ser necesario para los enfoques terapéuticos basados en anticuerpos que usan CLDN6 como objetivo.

40 La alineación de secuencias de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 que se muestra en la Figura 1 ilustra que hay un alto grado de conservación de CLDN6 a otras proteínas de claudina. Esta alta homología de CLDN6 con otras proteínas claudinas, en particular CLDN9 y CLDN4, y el hecho de que el documento núm. WO 2009/087978 no proporciona anticuerpos específicos para CLDN6 sugieren que no puede ser posible producir anticuerpos que se unan específicamente a CLDN6.

45 Resumen de la invención

Los resultados experimentales descritos en la presente descripción confirman que CLDN6 se expresa en diferentes células cancerosas humanas, mientras que la expresión en tejidos normales está limitada a la placenta.

50 Además, la presente invención describe la producción exitosa de anticuerpos específicos para CLDN6 capaces de unirse a la superficie de células intactas que expresan a CLDN6. Los análisis FACS de células intactas que expresan a CLDN6 mostraron la unión específica de anticuerpos anti-CLDN6 mientras que ninguna unión se observó para las células que expresan otras proteínas claudinas, en particular, CLDN3, CLDN4 y CLDN9, o células que no expresan ninguna de estas proteínas CLDN. Así, la presente invención demuestra inesperadamente que se puede producir un anticuerpo que realiza específicamente una reacción antígeno-anticuerpo con CLDN6 en la superficie de células que expresan a CLDN6, pero que no realizan esencialmente la reacción antígeno-anticuerpo con otras claudinas altamente homólogas.

60 La presente invención generalmente proporciona anticuerpos útiles como agentes terapéuticos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con células que expresan a CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, incluyendo las enfermedades relacionadas con tumores, en particular cáncer, tal como cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de

páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células claras de células renales y carcinoma papilar de células renales, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo 5 cáncer de ileon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de ileon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinales del testículo, y sus formas metastásicas.

La invención se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a CLDN6, preferentemente a CLDN6 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN6 y es capaz de discriminar entre CLDN6 en la superficie de una célula que expresa CLDN6 y un mutante de CLDN6 en la superficie de una célula que expresa dicho mutante de CLDN6, en donde dicho mutante de CLDN6 comprende una mutación de alanina en la posición 35, 37 o 39 de la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 2 o la sec. con núm. de ident.: 8, y en donde el anticuerpo comprende una 10 cadena pesada del anticuerpo que comprende una secuencia de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en ARDYGVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, ARDYGFLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, ARDFGYVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38 y ARDYGVFDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40. Preferentemente, el anticuerpo no es esencialmente capaz de unirse a CLDN9 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN9. Preferentemente, el anticuerpo no es esencialmente capaz de unirse a CLDN4 asociada con la superficie de una célula que expresa CLDN4 y/o no es esencialmente capaz de unirse a CLDN3 asociada con la superficie de una célula que expresa CLDN3. Con preferencia superlativa, el anticuerpo no es esencialmente capaz de unirse a una proteína CLDN 20 distinta de CLDN6 asociada con la superficie de una célula que expresa dicha proteína CLDN y es específica para CLDN6. Preferentemente, dicha célula que expresa dicha proteína CLDN es una célula intacta, en particular una célula no permeabilizada, y dicha proteína CLDN asociada con la superficie de una célula tiene una conformación nativa, es decir, no desnaturalizada. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de unirse a uno o más epítomos de CLDN6 en su conformación nativa.

En una modalidad, el anticuerpo es capaz de unirse a un epítopo localizado dentro de una porción extracelular de CLDN6, en donde dicha porción extracelular de CLDN6 comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos de cualquiera de sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 6 o la sec. con núm. de ident.: 7, con mayor preferencia la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 6. Preferentemente, el anticuerpo es 30 capaz de unirse a un epítopo localizado dentro de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 6 o la sec. con núm. de ident.: 7.

En una modalidad, el anticuerpo es capaz de unirse a CLDN6 interactuando al menos con uno, preferentemente, más de uno, tal como 2, 3, 4 o 5, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Thr33, Phe35, Gly37, Ser39, Ile40 y Leu151, preferentemente, interactuando al menos con uno, preferentemente, más de uno, preferentemente, todos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Thr33, Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40, con mayor preferencia al interactuar al menos con uno, preferentemente, más de uno, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40 o que consiste en Thr33, Phe35, Gly37 y Ser39, y, en particular, interactuando al menos con uno, preferentemente, más de uno, preferentemente, todos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Phe35, Gly37 y Ser39. Preferentemente, el anticuerpo no interacciona con uno o más, preferentemente, todos los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Glu154, Ala155, Arg158 y Gly161, y preferentemente, no interactúa con uno o más, preferentemente, todos los aminoácidos 40 seleccionados del grupo que consiste en de Arg158 y Gly161.

La interacción entre un anticuerpo y CLDN6, en particular en su conformación nativa, puede analizarse mediante una mutagénesis de aminoácidos por barrido de alanina. Los mutantes de CLDN6 pueden evaluarse por su capacidad de unirse a anticuerpos monoclonales específicos. La unión alterada de un anticuerpo monoclonal específico a un mutante de CLDN6 sugiere que el aminoácido mutado es un residuo de contacto importante. La unión puede analizarse, por 50 ejemplo, mediante citometría de flujo.

En una modalidad, el anticuerpo puede obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos la 60 sec. con núm. de ident.: 6 o la sec. con núm. de ident.: 7 o un péptido inmunológicamente equivalente, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicho péptido.

En diferentes modalidades, la CLDN6 a la que el anticuerpo es capaz de unirse tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2 o la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. Se prefiere, particularmente,

que el anticuerpo sea capaz de unirse a CLDN6 que tiene la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 2 y capaz de unirse a CLDN6 que tiene la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 8.

5 En una modalidad, un anticuerpo descrito en la presente comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende al menos una, preferentemente, dos, con mayor preferencia las tres secuencias CDR de una secuencia de cadena pesada de anticuerpo seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 34, 36, 38 y 40, o una variante de estas. Las secuencias de CDR se marcan por una caja en las secuencias de la cadena pesada del anticuerpo que se mencionan anteriormente y se muestran en la Figura 25.

10 En una modalidad, un anticuerpo de la descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, Leu o Phe, con mayor preferencia Leu. En una modalidad, dicho anticuerpo
15 comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 o Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definió anteriormente. En una modalidad, dicho anticuerpo comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definió anteriormente. En una modalidad, dicho anticuerpo
20 comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definió anteriormente. En una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con las modalidades anteriores comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 47 o una variante de esta y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 48 o una variante de esta.

25 En una modalidad, un anticuerpo de la descripción comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena pesada del anticuerpo seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 34, 36, 38 y 40 o una variante de estas.

30 En una modalidad, la descripción describe un anticuerpo, que comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende al menos una, preferentemente dos, con mayor preferencia las tres secuencias de CDR de una secuencia de la cadena ligera del anticuerpo seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 35, 37, 39 y 41, o una variante de estas. Las secuencias de CDR están marcadas por una caja en las secuencias de la cadena ligera del anticuerpo mencionadas anteriormente que se muestran en la Figura 26.

35 En una modalidad, un anticuerpo descrito en la presente comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, Ser o Asn, con mayor preferencia Ser, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, con mayor preferencia Tyr, Ser o Asn, con preferencia superlativa Asn, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, Ser o Tyr, con mayor preferencia Tyr. En una modalidad, dicho anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo que
40 comprende la secuencia de CDR3 Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definió anteriormente. En una modalidad, dicho anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en donde Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son como se definió anteriormente. En una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con las modalidades anteriores comprende una cadena ligera del anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 52 o una
45 variante de esta y/o la secuencia de CDR2 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 53 o una variante de esta.

50 En una modalidad, un anticuerpo de la descripción comprende una cadena ligera del anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena ligera del anticuerpo seleccionada de las sec. con núms. de ident.: 35, 37, 39 y 41 o una variante de estas.

En diversas modalidades, un anticuerpo comprende una cadena pesada de anticuerpo como se discutió anteriormente y, además, una cadena ligera de anticuerpo como se discutió anteriormente.

En una modalidad, un anticuerpo comprende:

55 (i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende al menos una, preferentemente, dos, con mayor preferencia las tres secuencias CDR de una secuencia de la cadena pesada del anticuerpo de sec. con núm. de ident.: x, o una variante de esta, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende al menos una, preferentemente, dos, con mayor preferencia las tres secuencias de CDR de una secuencia de la cadena ligera del anticuerpo de sec. con núm. de ident.: x+1, o una variante de esta;

60 en donde, x se selecciona de 34, 36, 38 y 40.

Las secuencias de CDR se marcan por una caja en las secuencias de la cadena pesada del anticuerpo y las secuencias de la cadena ligera del anticuerpo anteriormente mencionadas, respectivamente, mostradas en la Figura 25 y Figura 26, respectivamente.

65

En una modalidad, un anticuerpo comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp y Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, Leu o Phe, con mayor preferencia Leu, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en donde Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, Ser o Asn, con mayor preferencia Ser, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, con mayor preferencia Tyr, Ser o Asn, con preferencia superlativa Asn, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, Ser o Tyr, con mayor preferencia Tyr.

En una modalidad, un anticuerpo de acuerdo con las modalidades anteriores comprende (i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 47 o una variante de esta y/o la secuencia CDR2 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 48 o una variante de esta y/o (ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 52 o una variante de esta y/o la secuencia de CDR2 de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 53 o una variante de esta.

En una modalidad, un anticuerpo comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena pesada del anticuerpo de sec. con núm. de ident.: x o una variante de esta, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de la cadena ligera del anticuerpo de sec. con núm. de ident.: x+1 o una variante de esta;

en donde, x se selecciona de 34, 36, 38 y 40.

En modalidades preferidas, el anticuerpo tiene una o más de las actividades siguientes: (i) destrucción de una célula que expresa CLDN6, (ii) inhibición de la proliferación de una célula que expresa CLDN6, (iii) inhibición de la formación de colonias de una célula que expresa CLDN6, (iv) mediación de la remisión, es decir, reducción de tamaño, preferentemente, remisión completa, es decir, la desaparición completa, de los tumores establecidos, (v) prevención de la formación o la reformación de tumores, y (vi) inhibición de la metástasis de una célula que expresa CLDN6. En consecuencia, el anticuerpo puede usarse para una o más de las funciones anteriores, en particular, cuando se administra a un paciente. Tal destrucción de células y/o inhibición de una o más actividades de las células puede utilizarse terapéuticamente como se describe en la presente descripción. En particular, la destrucción de las células, la inhibición de la proliferación de las células y/o la inhibición de la formación de colonias de las células pueden utilizarse para tratar o prevenir el cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer. La inhibición de la proliferación, formación de colonias y/o metástasis de las células puede utilizarse, en particular, para tratar o prevenir la metástasis del cáncer y la diseminación metastásica de las células cancerosas. Preferentemente, el anticuerpo media la destrucción de las células mediante la inducción de la lisis mediada por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente mediante la inducción de la lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Sin embargo, la presente descripción incluye, además, modalidades en las que el anticuerpo ejerce su actividad como se describe en la presente descripción tal como la destrucción de las células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, por ejemplo, proliferación celular y/o formación de colonias, sin inducir lisis mediada por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis. Por ejemplo, el anticuerpo descrito en la presente descripción puede ejercer, además, un efecto uniéndose simplemente a CLDN6 en la superficie celular, por ejemplo, bloqueando, por lo tanto, la proliferación de las células. En una modalidad el anticuerpo no induce la lisis de las células mediada por CDC.

Preferentemente, la lisis de las células mediada por ADCC tiene lugar en presencia de células efectoras, que en modalidades particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y las PMN, y la fagocitosis es por macrófagos.

La actividad de inhibir o reducir la proliferación de las células que expresan CLDN6, preferentemente, las células cancerosas, puede medirse in vitro mediante la determinación de la proliferación de células cancerosas que expresan CLDN6 en un ensayo que usa bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse en el ADN recién sintetizado de las células replicantes (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. La detección del químico incorporado por medio del uso de, por ejemplo, anticuerpos específicos para BrdU indica que las células estuvieron activamente replicando su ADN.

La actividad de inhibir o reducir la formación de colonias de células que expresan CLDN6, preferentemente, células cancerosas, puede medirse in vitro en un ensayo clonogénico. Un ensayo clonogénico es una técnica de microbiología para estudiar la efectividad de agentes específicos en la supervivencia y proliferación de las células. Se usa con frecuencia en los laboratorios de investigación del cáncer para determinar el efecto de los fármacos o la radiación sobre

- las células tumorales en proliferación. El experimento implica tres etapas principales: (i) aplicar un tratamiento a una muestra de células, en particular células cancerosas, (ii) sembrar las células en un recipiente de cultivo tisular y (iii) dejar las células crecer. Las colonias producidas son fijadas, teñidas y contadas. La formación de colonias es importante con respecto a la formación de metástasis si las células tumorales individuales colonizan los órganos. La actividad inhibidora de los anticuerpos indica su potencial para suprimir la formación de metástasis. Los anticuerpos que tienen la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias en un ensayo clonogénico son, particularmente, útiles para tratar o prevenir la metástasis y la diseminación metastásica de células cancerosas, en particular, de los tipos de cáncer mencionados en la presente descripción.
- En modalidades preferidas, el anticuerpo exhibe una o más funciones efectoras inmunes contra una célula portadora de CLDN6 en su conformación nativa, en donde la una o más funciones efectoras inmunes se seleccionan preferentemente, del grupo que consiste en citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación, preferentemente, las funciones efectoras son ADCC y/o CDC.
- Preferentemente, dicha una o más actividades o una o más funciones efectoras inmunes exhibidas por dicho anticuerpo se inducen mediante la unión de dicho anticuerpo a CLDN6, preferentemente, a un epítipo localizado dentro de una porción extracelular de CLDN6, donde dicha porción extracelular de CLDN6 preferentemente, comprende la secuencia de aminoácidos de cualquier sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7, la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 6 o la sec. con núm. de ident.: 7, con mayor preferencia la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 6.
- De conformidad con la invención, una célula que expresa CLDN6 se caracteriza, preferentemente, por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Una célula que expresa CLDN6 o una célula portadora de CLDN6 en su conformación nativa, preferentemente, es una célula tumoral, tal como una célula cancerosa, preferentemente, una célula cancerosa de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células de transición y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células claras de células renales y carcinoma papilar de células renales, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular, adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular, un tumor de células germinales del testículo, y sus formas metastásicas.
- El anticuerpo de la invención se puede unir a uno o más restos efectoras terapéuticos, por ejemplo, radiomarcadores, citotoxinas, enzimas terapéuticas, agentes que inducen apoptosis, para proporcionar citotoxicidad dirigida, es decir, destrucción de células tumorales.
- En una modalidad el anticuerpo de la invención (i) se une a células que expresan CLDN6 y se caracteriza la asociación de CLDN6 con su superficie celular, y (ii) no se une a células que no expresan CLDN6 y no se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Preferentemente, el anticuerpo de la invención (i) media la destrucción y/o inhibe la proliferación de células que expresan CLDN6 y se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, y (ii) no media la destrucción y/o no inhibe la proliferación de células que no expresan CLDN6 y no se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular.
- En modalidades preferidas particulares, el anticuerpo de la invención se une a epítopos nativos de CLDN6 presentes en la superficie de las células vivas tales como las de sec. con núms. de ident.: 6 o 7. En modalidades preferidas adicionales, el anticuerpo de la invención es específico para células cancerosas que expresan CLDN6 y no se une a células cancerosas que no expresan CLDN6.
- Los anticuerpos de la invención pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobaya y ser humano. Los anticuerpos de la invención incluyen, además, moléculas quiméricas en las que una región constante del anticuerpo derivada de una especie, preferentemente humana, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con las regiones constantes y marco de origen humano.
- Los anticuerpos descritos en la presente descripción incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen anticuerpos IgG2a (por ejemplo, IgG2a, κ, λ), IgG2b (por ejemplo, IgG2b, κ, λ), IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ, λ) e IgM. Sin embargo, la presente invención abarca, además, otros isotipos de anticuerpos, que incluyen anticuerpos IgG1, IgA1,

IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o sus fragmentos de unión al antígeno que incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, fragmentos Fv de cadena simple o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión al antígeno incluyen las proteínas de fusión al dominio de unión de la inmunoglobulina que comprenden (i) un dominio de unión del polipéptido (tal como una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera) que se fusiona a un polipéptido de la región de bisagra de la inmunoglobulina (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. Dichas proteínas de fusión al dominio de unión de la inmunoglobulina se describen adicionalmente en los documentos de patentes núms. US2003/0118592y US 2003/0133939.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo. Los anticuerpos incluyen anticuerpos completamente humanos. Tales anticuerpos pueden producirse en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLDN6 sometiéndose a recombinación V-D-J y a cambio de isotipo. Tal animal transgénico puede ser, además, un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tal como se describe en el documento núm. US 2003/0017534.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción, preferentemente, se disocian, de CLDN6 con una constante de equilibrio de disociación (KD) de aproximadamente 1-100 nM o menos. Preferentemente, los anticuerpos descritos en la presente descripción no reaccionan de forma cruzada con los antígenos de superficie celular relacionados y, por lo tanto, no inhiben su función.

En modalidades preferidas, los anticuerpos de la presente descripción pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad para CLDN6;
- b) una afinidad de unión a CLDN6 de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente, de aproximadamente 5-10 nM o menos y, con mayor preferencia, de aproximadamente 1-3 nM o menos,
- c) la capacidad de inducir CDC de células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- d) la capacidad de inhibir el crecimiento de células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- e) la capacidad de inducir apoptosis de células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- f) la capacidad de inducir adhesión homotípica de células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- g) la capacidad de inducir ADCC de células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en presencia de células efectoras;
- h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene células tumorales que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- i) la capacidad de agotar las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular;
- j) la capacidad de agregar CLDN6 en la superficie de las células vivas.

Un anticuerpo preferido descrito en la presente descripción es un anticuerpo producido o que puede obtenerse a partir de una célula de hibridoma depositada en DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) y que tiene una de las siguientes designaciones y números de acceso:

1. GT512muMAB 59A, núm. de acceso DSM ACC3067, depositado el 21 de junio de 2010;
2. GT512muMAB 60A, núm. de acceso DSM ACC3068, depositado el 21 de junio de 2010;
3. GT512muMAB 61D, núm. de acceso DSM ACC3069, depositado el 21 de junio de 2010;
4. GT512muMAB 64A, núm. de acceso DSM ACC3070, depositado el 21 de junio de 2010;
5. GT512muMAB 65A, núm. de acceso DSM ACC3071, depositado el 21 de junio de 2010;
6. GT512muMAB 66B, núm. de acceso DSM ACC3072, depositado el 21 de junio de 2010;
7. GT512muMAB 67A, núm. de acceso DSM ACC3073, depositado el 21 de junio de 2010;
8. GT512muMAB 55A, núm. de acceso DSM ACC3089, depositado el 31 de agosto de 2010; o
9. GT512muMAB 89A, núm. de acceso DSM ACC3090, depositado el 31 de agosto de 2010.

Los anticuerpos de la descripción se designan en la presente descripción mediante la referencia a la designación del anticuerpo y/o mediante la referencia al clon que produce el anticuerpo, por ejemplo, muMAB 59A.

Otros anticuerpos preferidos son los que tienen la especificidad de los anticuerpos producidos y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente y, en particular, los que comprenden una porción de unión al antígeno o sitio de unión al antígeno, en particular, una región variable, idéntica o altamente homóloga al de los anticuerpos producidos y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente. Se contempla que los anticuerpos preferidos son aquellos que tienen las regiones CDR idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos producidos y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente. Por "altamente homólogo" se contempla que a partir de 1 a 5,

preferentemente, a partir de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones de aminoácidos pueden hacerse en cada región de CDR. Los anticuerpos particularmente preferidos son las formas quimerizadas y humanizadas de los anticuerpos producidos y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente.

- 5 Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en (i) un anticuerpo producido u obtenible a partir de un clon depositado bajo el núm. de acceso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A), o DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A), (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo en (i) y (iii) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo en (i) caracterizado por comprender un conjunto de los HCDR y LCDR seleccionados del grupo que consiste en
- 10 (a) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGYVLDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSIYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35;
- 15 (b) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGFVLDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSNYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37;
- 20 (c) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGI identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDFGYVLDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSTYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39; y
- 25 (d) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGYVFDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVNY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRNNYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41. La porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo en (i) puede comprender la región variable del anticuerpo en (i).

40 La presente descripción se refiere, además, a una célula tal como una célula de hibridoma que produce un anticuerpo como se describe en la presente descripción.

Las células de hibridoma preferidas son aquellas depositadas en DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) y que tienen una de las siguientes designaciones y números de acceso:

- 45 1. GT512muMAB 59A, núm. de acceso DSM ACC3067, depositado el 21 de junio de 2010;
2. GT512muMAB 60A, núm. de acceso DSM ACC3068, depositado el 21 de Junio de 2010;
3. GT512muMAB 61D, núm. de acceso DSM ACC3069, depositado el 21 de Junio de 2010;
4. GT512muMAB 64A, núm. de acceso DSM ACC3070, depositado el 21 de Junio de 2010;
- 50 5. GT512muMAB 65A, núm. de acceso DSM ACC3071, depositado el 21 de Junio de 2010;
6. GT512muMAB 66B, núm. de acceso DSM ACC3072, depositado el 21 de Junio de 2010;
7. GT512muMAB 67A, núm. de acceso DSM ACC3073, depositado el 21 de Junio de 2010;
8. GT512muMAB 55A, núm. de acceso DSM ACC3089, depositado el 31 de Agosto de 2010; o
9. GT512muMAB 89A, núm. de acceso DSM ACC3090, depositado el 31 de Agosto de 2010.

55 Los anticuerpos anti-CLDN6 de la presente descripción pueden derivarse, enlazarse o coexpresarse en otras uniones específicas. En una modalidad particular, la descripción describe una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para CLDN6 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CLD6 o mimético de este), y una segunda especificidad de unión para la célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor Fc (por ejemplo, un receptor gamma Fc, tales como RI gamma Fc, o cualquier otro receptor Fc) o un receptor de células T, por ejemplo, CD3.

65 En consecuencia, la presente enseñanza incluye las moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CLDN6 como a un receptor Fc o un receptor de células T, por ejemplo, CD3. Los ejemplos de receptores Fc son el receptor de IgG, el receptor gamma Fc (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). Otros receptores Fc, tal como los receptores de IgA (por ejemplo, FcαRI), pueden orientarse también. El receptor Fc se

5 localiza, preferentemente, en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una modalidad preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor Fc en un sitio que es distinto al sitio de unión del receptor Fc de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG o IgA). Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no se bloquea con los niveles fisiológicos de las inmunoglobulinas.

10 En aún otro aspecto, los anticuerpos anti-CLDN6 de la descripción se derivan, enlazan o coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo como se describe en la presente descripción puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra forma) a una u otras muchas entidades moleculares, tales como otro anticuerpo, (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o uno multiespecífico), una citotoxina, antígeno o ligando celular (por ejemplo, para producir un inmunocombinado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente descripción puede unirse a otras porciones terapéuticas, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticancerígeno de molécula pequeña, una citocina o quimioterapia recombinante. En consecuencia, la presente enseñanza abarca una gran variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, las cuales se unen a las células que expresan CLDN6 y/o a las células que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular y que pueden usarse para dirigir otras moléculas a células de este tipo.

20 Generalmente, para los propósitos de la presente enseñanza, todos los derivados de anticuerpos tales como conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión descritos en la presente descripción se incluyen en el término "anticuerpo".

25 En un aspecto adicional, la enseñanza prevé, además, las proteínas que se unen a CLDN6 derivadas de los dominios no inmunoglobulínicos, en particular, las proteínas monocatenarias. Tales proteínas de unión y métodos para su producción se describen, por ejemplo, en Binz y otros, (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268. Debe entenderse que las enseñanzas dadas en la presente descripción con respecto a las moléculas de unión de la inmunoglobulina o derivadas de la inmunoglobulina se aplican, además, en correspondencia con las moléculas de unión derivadas de los dominios no inmunoglobulínicos. En particular, por medio del uso de tales moléculas de unión derivadas de los dominios no inmunoglobulínicos es posible bloquear CLDN6 de las células que expresan dicho objetivo y que se caracterizan por la asociación de dicho objetivo con su superficie celular y así, para producir efectos terapéuticos como se describe en la presente descripción para los anticuerpos de la invención, en particular, la inhibición de una o más actividades de las células tumorales como se describe en la presente descripción tal como la proliferación. Aunque no es obligatorio, es posible conferir funciones efectoras de anticuerpos a tales moléculas que no se unen a las inmunoglobulinas, por ejemplo, fusión a la región Fc de anticuerpos.

35 La presente enseñanza generalmente abarca el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades, en particular, enfermedades tumorales, mediante la orientación de CLDN6 expresado por las células y por la asociación con la superficie de las células. Estos métodos proporcionan la detección y/o erradicación selectiva de tales células minimizando de este modo, los efectos adversos para las células normales que no expresan CLDN6 y que no se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Las enfermedades preferidas para una terapia o diagnóstico son aquellas en las que se involucran las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por asociación de CLDN6 con su superficie celular, tales como las enfermedades tumorales, en particular, las enfermedades de cáncer tales como las descritas en la presente descripción.

45 En un aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones/estuches farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de la invención. Una composición farmacéutica de la invención puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente, puede comprender uno o más adyuvantes, estabilizantes, etc. En una modalidad particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a epítopos distintos o que poseen características funcionales distintas, tales como inducir CDC y/o ADCC e inducir apoptosis. En esta modalidad de la invención, los anticuerpos pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLDN6 que tienen actividades diferentes pero complementarias pueden combinarse en una única terapia para lograr un efecto terapéutico deseado. En una modalidad preferida, la composición incluye un anticuerpo anti-CLDN6 que media CDC combinado con otro anticuerpo anti-CLDN6 que induce apoptosis. En otra modalidad, la composición incluye un anticuerpo anti-CLDN6 que media la destrucción altamente efectiva de células objetivo en la presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo anti-CLDN6 que inhibe el crecimiento de células que expresan CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular.

60 La presente enseñanza incluye, además, la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-CLDN6 de la invención, donde preferentemente al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-CLDN6 quimérico y al menos otro anticuerpo es un anticuerpo anti-CLDN6 humano, los anticuerpos que se unen a epítopos de CLDN6 similares o diferentes. Preferentemente, un anticuerpo quimérico CLDN6 descrito en la presente descripción se administra primero seguido de la administración de un anticuerpo anti-CLDN6 humano de la invención, en donde el anticuerpo anti-CLDN6 humano se administra, preferentemente, durante un período prolongado de tiempo, es decir, como terapia de mantenimiento.

65

Los anticuerpos, los conjugados, las moléculas biespecíficas/multiespecíficas y las composiciones de la presente invención pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular y/o destrucción selectiva de las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular al poner en contacto las células con una cantidad efectiva del anticuerpo, conjugado, molécula o composición biespecífica/multiespecífica, de manera que se inhibe el crecimiento de la célula y/o se destruye la célula. En una modalidad, el método incluye la destrucción de la célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, opcionalmente en presencia de las células efectoras, por ejemplo, mediante CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis o mediante una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular que pueden inhibirse o destruirse por medio del uso de los anticuerpos de la invención incluyen las células cancerosas.

Los anticuerpos, los conjugados y las moléculas y composiciones biespecíficas/multiespecíficas de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades que implican las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular mediante la administración de los anticuerpos a pacientes que sufren de tales enfermedades. Las enfermedades ejemplares que pueden tratarse (por ejemplo, mejorarse) o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades tumorigénicas. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas, que pueden tratarse y/o prevenirse, incluyen las enfermedades cancerosas tales como cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma escamoso de pulmón y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma celular basal y carcinoma celular escamoso, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluido cáncer de íleon, en particular, adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma del íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular, un tumor de células germinales del testículo, y sus formas metastásicas.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que involucra las células que expresan CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular que comprende administrar a un sujeto el anticuerpo, conjugado, molécula o composición biespecífica/multiespecífica de la invención. Preferentemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores y en modalidades particulares se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma celular basal y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, incluyendo carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular, adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular, un tumor de células germinales del testículo y sus formas metastásicas. CLDN6 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

La invención puede implicar el uso de los agentes y composiciones descritos en la presente descripción para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades tumorales, es decir, para tratar a un paciente que tiene una enfermedad tumoral o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad tumoral. En un aspecto, la invención proporciona los métodos para inhibir el crecimiento tumoral que comprende la administración de uno o más de los agentes y composiciones descritas en la presente descripción.

Preferentemente, los agentes y composiciones descritos en la presente descripción se administran de manera que la sustancia terapéuticamente activa no se suministra o no se suministra esencialmente a un tejido u órgano en donde las células expresan CLDN6 cuando el tejido u órgano está libre de tumores y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, tal como el tejido placentario o la placenta. Para este fin, los agentes y composiciones descritos en la presente descripción pueden administrarse localmente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo como se describe en la presente descripción para uso en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción. En una modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica como se describe en la presente para su uso en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción.

5

El sujeto al que se administra el anticuerpo puede tratarse adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo, un receptor gamma Fc, tal como una citocina. Las citocinas típicas para la administración durante el tratamiento incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, taxotere, 5-fluoruracilo, metotrexato, gemzitabina y ciclofosfamida.

10

En aún otro aspecto, la descripción se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos tal como ratones con CLDN6 humana o un fragmento peptídico de este para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son los seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 6, de la sec. con núm. de ident.: 7, de la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15, y péptidos inmunológicamente equivalentes.

15

El tipo silvestre así como animales transgénicos no humanos pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CLDN6 o un fragmento peptídico de este y/o ácidos nucleicos y/o células que expresan CLDN6 o un fragmento peptídico de este. Preferentemente, el animal transgénico no humano es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLDN6 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) mediante la recombinación V-D-J y el cambio de isotipo. La conmutación de isotipo puede producirse, por ejemplo, mediante el cambio de isotipo clásico o no clásico.

20

25

En consecuencia, en otro aspecto más, se describen las células B aisladas, de un animal no humano como se describió anteriormente. Las células B aisladas pueden immortalizarse después por fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos de la invención. Tales hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la invención) se incluyen, además, dentro del alcance de la invención.

30

En un aspecto adicional, se describen métodos para el diagnóstico, detección o control de una enfermedad tumoral, que comprenden dichos métodos la detección y/o determinación de la cantidad de CLDN6 o células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en una muestra biológica aislada de un paciente por medio del uso de un anticuerpo de la invención. La muestra biológica puede aislarse de un paciente que tiene una enfermedad tumoral, que se sospecha que tiene o se enferma con una enfermedad tumoral o que tiene una predisposición potencial para una enfermedad tumoral.

35

En una modalidad del método para el diagnóstico, detección o control de una enfermedad tumoral de acuerdo con la presente enseñanza, una muestra biológica y/o una muestra control/referencia de un tejido u órgano correspondiente al tejido u órgano que debe diagnosticarse, detectarse o controlarse con respecto a la afección por una enfermedad tumoral, por ejemplo, la enfermedad tumoral que debe diagnosticarse, detectarse o controlarse es el cáncer de ovario y la muestra biológica y/o la muestra control/referencia es el tejido ovárico. Tales tejidos y órganos se describen en la presente descripción, por ejemplo, en relación con diferentes enfermedades tumorales y cánceres.

40

45

En una modalidad de los métodos para diagnóstico, detección o control de una enfermedad tumoral, la muestra biológica es de un tejido u órgano en donde las células cuando el tejido u órgano está libre de tumores no expresan esencialmente CLDN6 y no se caracterizan por la asociación sustancial de CLDN6 con su superficie celular. Preferentemente, dicho tejido es un tejido diferente al tejido de la placenta.

50

Típicamente, el nivel de una molécula objetivo en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en donde una desviación de dicho nivel de referencia es indicativo de la presencia y/o etapa de una enfermedad tumoral en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano) o un nivel mediano de sujetos sanos. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, tal como un aumento o disminución en al menos 10%, 20% o 30%, preferentemente en al menos 40% o 50%, o incluso más. Preferentemente, la presencia de CLDN6 o células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en dicha muestra biológica o una cantidad de CLDN6 o células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en la muestra biológica que aumenta en comparación con un nivel de referencia indica la presencia de una enfermedad tumoral.

55

60

Típicamente, la detección y/o determinación de la cantidad en los métodos de la presente enseñanza implica el uso de anticuerpos marcados que se unen específicamente a una molécula objetivo.

En un aspecto particular, la presente enseñanza abarca un método para la detección, es decir, determinar la posición o el sitio, de una enfermedad tumoral, por ejemplo, un tejido u órgano particular, que comprende administrar un anticuerpo

65

de la presente invención que se acopla a un marcador detectable en un paciente. El marcaje de un tejido u órgano en dicho paciente puede indicar la presencia o el riesgo de una enfermedad tumoral en dicho tejido u órgano.

5 Como se ejemplifica en la presente descripción, los anticuerpos de la invención pueden obtenerse directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o pueden clonarse y expresarse por vía recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son los microorganismos, tales como E. coli, y los hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse por vía recombinante en un animal o planta transgénica no humana. Sin embargo, la presente invención prevé, además, las modalidades en donde los anticuerpos se producen mediante inmunización o vacunación por medio del uso de las estrategias de inmunización in situ en un paciente como se describe en la presente descripción.

15 La presente enseñanza se refiere, además, a los ácidos nucleicos que comprenden los genes o las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o sus partes, por ejemplo, una cadena de anticuerpo, como se describe en la presente descripción. Los ácidos nucleicos pueden comprenderse en un vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender otros genes tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Además, los vectores pueden comprender elementos de control de la expresión que permiten la expresión adecuada de las regiones codificantes en los huéspedes adecuados. Tales elementos de control se conocen por el técnico y pueden incluir un promotor, un casete de empalme y un codón de iniciación de la traducción.

25 Preferentemente, dicho ácido nucleico está unido operativamente a las secuencias control de la expresión anteriores permitiendo la expresión en células eucariotas y procariotas. Los elementos de control que aseguran la expresión en las células eucariotas y procariotas se conocen bien por aquellos con experiencia en la materia.

Los métodos para la construcción de las moléculas de ácido nucleico, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células huésped apropiadamente seleccionadas, para causar o lograr la expresión se conocen bien en la materia.

30 Un aspecto adicional de la presente enseñanza se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector como se describe en la presente descripción.

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

35 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Alineación de secuencia de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9.

40 Figura 2. Análisis por inmunofluorescencia de los sueros obtenidos de ratones inmunizados para producir anticuerpos específicos para CLDN6.

(A) Células CHO-K1 no fijadas cotransfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN6 y GFP humanas, respectivamente, se probaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CLDN6 (R&D Systems, MAB3656). CLDN6 está localizado en la membrana plasmática de las células transfectadas y puede dirigirse a las células vivas mediante los anticuerpos específicos.

(B) Suero de un ratón sobre el cual se produjo el hibridoma F3-6C3-H8 contenía anticuerpos que se unen a CLDN6 en la superficie de células CHO-K1 no fijadas cotransfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN6 y GFP humanos.

50 Figura 3. Análisis de la inmunoelectrotransferencia para evaluar la expresión endógena de las proteínas de claudina en las células HEK293T.

Los lisados de proteínas de células HEK293T transfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o simuladamente transfectadas se probaron mediante inmunoelectrotransferencia por medio del uso de anti-CLDN3(A) comercialmente disponible (Invitrogen, núm. de catálogo 34-1700), anticuerpos anti-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), anti-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) y anti-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672). Los anticuerpos detectaron la expresión de sus correspondientes objetivos solo en los transfectantes HEK293T respectivos. No se observó expresión endógena de ninguna de estas claudinas en las células HEK293T no transfectadas.

60 Figura 4. Análisis por citometría de flujo para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-CLDN comercialmente disponibles.

Se determinó la unión de los anticuerpos anti-CLDN comercialmente disponibles a las células HEK293T transfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o sin transfectar mediante citometría de flujo. Solo el anticuerpo anti-CLDN3 comercialmente disponible es específico para su objetivo.

Figura 5. Análisis por citometría de flujo para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-CLDN preparados de acuerdo con la invención.

Se determinó la unión de anticuerpos en los sobrenadantes a partir de los subclones de hibridoma monoclonal a las células HEK293T cotransfectadas con un vector que codifica CLDN6, CLDN3, CLDN4 o CLDN9 y un vector que codifica un marcador de fluorescencia mediante citometría de flujo.

(A) Anticuerpos en el sobrenadante a partir del subclón de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 se unen específicamente a las células transfectadas con CLDN6 pero no a las células transfectadas con CLDN3, CLDN4 y CLDN9, respectivamente. Por el contrario, los anticuerpos en el sobrenadante a partir del subclón de hibridoma monoclonal F4-4F7-F2 se unen a las células transfectadas con CLDN6 o CLDN9. Los anticuerpos en el sobrenadante del subclón de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 se unen, además, a las células transfectadas con la variante (I143V)-SNP de CLDN6.

(B) Anticuerpos en el sobrenadante a partir del subclón de hibridoma monoclonal F3-7B3-B4 se unen a las células transfectadas con CLDN6, CLDN3 o CLDN9. Los anticuerpos en el sobrenadante a partir del subclón de hibridoma monoclonal F3-3F7-A5 se unen a las células transfectadas con CLDN6, CLDN4 o CLDN9.

Figura 6. Especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A.

La unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6, 3, 4, 9 humano y la variante I143V de CLDN6 SNP (polimorfismo de un solo nucleótido) se analizó por citometría de flujo por medio del uso de las células HEK293T que expresan transitoriamente la claudina humana correspondiente. HEK293T se cotransfectaron con un marcador de fluorescencia para distinguir entre las células no transfectadas (población Q1 y Q3) y transfectadas (población Q2 y Q4). La concentración de anticuerpo usada fue la concentración que saturó la unión a CLDN6 (25 µg/ml). La expresión de CLDN6, 3, 4, 9 humana y CLDN6-SNP(I143V) se confirmó con anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente contra la claudina-6 humana (R&D Systems, MAB3656), claudina-3 humana (R&D Systems, MAB4620) y claudina-4 humana (R&D Systems, MAB 4219).

Figura 7. Afinidades relativas de anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A.

Para determinar las afinidades relativas, se analizó mediante citometría de flujo la unión de anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6 humana expresada de forma estable en la superficie de las células HEK293. En el experimento de unión por saturación, la concentración de los anticuerpos se graficó frente a las señales FACS (mediana de la intensidad de fluorescencia). La EC50 (concentración de anticuerpo que se une a la mitad de los sitios de unión en equilibrio) se calculó mediante regresión no lineal. Los anticuerpos específicos de CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A exhibieron valores muy bajos de EC50 (EC50 200-500 ng/ml) y la saturación de la unión se logró a bajas concentraciones.

Figura 8. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A.

La actividad CDC de anticuerpos anti-CLDN6 se analizó por medio del uso de un ensayo dependiente de luciferasa para detectar ATP endógeno dentro de células no lisadas. Por lo tanto, las células CHO-K1 que expresan establemente CLDN6 humana se trataron con diferentes concentraciones de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A. MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A exhibieron actividad de CDC dependiente de la dosis y CDC inducida a bajas concentraciones.

Figura 9. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B en células NEC8 LVTS2 54 (expresión CLDN6 disminuida) y NEC8 que expresan endógenamente CLDN6.

Los anticuerpos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B indujeron CDC en células NEC8 de una manera dependiente de la dosis. Se demostró la especificidad objetivo de muMAB 65A y 66B por medio del uso de las células NEC8 LVTS2 54 (CLDN6 reducida).

Figura 10. Efecto terapéutico de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo usó xenoinjertos de NEC8 que expresan endógenamente CLDN6 en ratones atímicos desnudos-*Foxn1*^{nu}. En comparación con el grupo de control de la solución salina, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron una inhibición del crecimiento tumoral en ratones injertados con células NEC8.

Figura 11. Especificidad de unión de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A.

La unión de anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6, 3, 4 y 9, humana respectivamente, se analizó mediante citometría de flujo por medio del uso de células HEK293 que expresan establemente la claudina humana correspondiente. La concentración del anticuerpo usada fue la concentración que saturó la unión (25 µg/ml). La expresión de CLDN3, 4, 6 y 9 humano se confirmó con los anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles contra claudina-3 humana (R&D Systems, MAB4620) y claudina-4 humana (R&D Systems, MAB 4219), y el anticuerpo monoclonal murino muMAB 5F2D2 reactivo a CLDN6/9, respectivamente. El control negativo se llevó a cabo en condiciones idénticas sin anticuerpo primario.

Figura 12. Afinidades relativas de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A a las células HEK293-CLDN6.

Para determinar las afinidades relativas, se analizó mediante citometría de flujo la unión de anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6 humana expresada de forma estable en la superficie de las células HEK293. En el experimento de unión por saturación, la concentración de los anticuerpos se graficó frente a las señales FACS (mediana de la intensidad de fluorescencia). La EC50 (concentración de anticuerpo que se une a la mitad de los sitios de unión en equilibrio) se calculó mediante regresión no lineal. Los anticuerpos específicos para CLDN6 chimAB 64A y 89A exhibieron valores muy bajos de EC50 (EC50 450-600 ng/ml) y la saturación de la unión se logró a bajas concentraciones. ChimAB 67A y 61D mostraron valores EC50 bajos (EC50 1000 ng/ml) y medios (EC50 2300 ng/ml), respectivamente.

Figura 13. Afinidades relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A a las células NEC8.

Para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a las células tumorales que expresan endógenamente la unión de CLDN6 humano a la línea celular de cáncer testicular NEC8 se analizó mediante citometría de flujo. Los anticuerpos específicos a CLDN6 chimAB 64A y 89A exhibieron valores de EC50 muy bajos (EC50 600-650 ng/ml) y la saturación de unión se logró a bajas concentraciones, mientras que chimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 medios (EC50 1700 ng/ml) y altos (EC50 6100 ng/ml), respectivamente.

Figura 14. Afinidades relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A a las células OV90.

Para determinar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a células tumorales que expresan endógenamente la unión de CLDN6 humano a la línea celular de cáncer de ovario OV90 se realizó un análisis mediante citometría de flujo. Los anticuerpos específicos de CLDN6 chimAB 64A y 89A exhibieron valores de EC50 muy bajos (EC50 550-600 ng/ml) y se alcanzó la saturación de la unión a bajas concentraciones. ChimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 medios (EC50 1500 ng/ml y EC50 2300 ng/ml, respectivamente).

Figura 15. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A en células NEC8 de tipo natural y NEC8 de expresión reducida.

La actividad CDC de anticuerpos anti-CLDN6 se analizó por medio del uso de un ensayo dependiente de luciferasa para detectar ATP endógeno dentro de células no lisadas. Por lo tanto, las células silvestres NEC8 (NEC8 LVTS2 77) que ectópicamente expresan la luciferasa se trataron con diferentes concentraciones de chimAB 61D, 64A, 67A y 89A. En células NEC8, chimAB 61D, 64A, 67A y 89A exhibieron actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis, mientras que en células NEC8 de expresión CLDN6 reducida (NEC8 LVTS2 54) ninguno de estos anticuerpos indujo lisis celular inespecífica. Este resultado demostró las funciones efectoras específicas a objetivo de chimAB 61D, 64A, 67A y 89A.

Figura 16. Actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A en células NEC8 de tipo natural y NEC8 de expresión reducida.

La actividad de ADCC de anticuerpos anti-CLDN6 se analizó por medio del uso de un ensayo dependiente de la luciferasa para detectar ATP endógeno dentro de células no lisadas. Por lo tanto, las células silvestres NEC8 (NEC8 LVTS2 77) se trataron con diferentes concentraciones de chimAB 61D, 64A, 67A y 89A. ChimAB 61D, 64A, 67A y 89A exhibieron actividad de ADCC dependiente de la dosis e indujeron ADCC incluso a bajas concentraciones de anticuerpos. Para demostrar la especificidad de objetivo, se usaron las células NEC8 con una expresión CLDN6 reducida estable (NEC8 LVTS2 54).

Figura 17. Efecto terapéutico a largo plazo de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 64A y 67A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo usó xenoinjertos NEC8 que expresan endógenamente CLDN6 en ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. Se trataron ratones durante 46 días con anticuerpos específicos a CLDN6. Después del tratamiento, se controló el crecimiento del tumor durante 60 días. Incluso después de suspender la inmunoterapia, los ratones tratados con anticuerpos monoclonales murinos muMAB 61D, 64A y 67A no mostraron ningún crecimiento tumoral.

Figura 18. Efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo usó xenoinjertos de NEC8 que expresan endógenamente CLDN6 en ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. Las transferencias de dispersión representan los volúmenes de tumores injertados a diferentes intervalos de tiempo durante el tratamiento temprano de los xenoinjertos de NEC8 en ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. En comparación con el grupo de control de la solución salina muMAB 89A mostró la inhibición del crecimiento tumoral en ratones injertados con células NEC8 (A). Se trataron ratones durante 47 días con PBS como control y el anticuerpo específico para CLDN6, respectivamente. El crecimiento tumoral se controló durante 51 días adicionales. En comparación con el control de PBS no hubo tumores detectables en los ratones tratados con muMAB89A al final del estudio (B).

Figura 19. Efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

Las transferencias dispersas representan volúmenes de tumores injertados en diferentes intervalos de tiempo durante el tratamiento de xenoinjertos avanzados de NEC8 en ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. La inmunoterapia con el anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A mostró una inhibición del crecimiento tumoral de los xenoinjertos sólidos de NEC8 en comparación con los grupos control de anticuerpo y solución salina.

Figura 20. Efecto terapéutico a largo plazo del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

15 días después del injerto, los ratones se trataron durante 45 días con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 64A. El crecimiento del tumor se controló durante 49 días adicionales (A). El gráfico de supervivencia mostró una supervivencia prolongada de ratones tratados con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 64A (B).

Figura 21. Efecto terapéutico de anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

Las transferencias de dispersión representan volúmenes de tumores NEC8 injertados en diferentes intervalos de tiempo durante el tratamiento de xenoinjertos avanzados de NEC8. En comparación con los grupos control de solución salina y anticuerpo, la inhibición del crecimiento tumoral se logró con los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A.

Figura 22. Efecto terapéutico a largo plazo de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

17 días después del injerto, los ratones se trataron durante 42 días con los anticuerpos específicos a CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A. El crecimiento tumoral se controló durante 49 días adicionales (A). La gráfica de supervivencia mostró una supervivencia prolongada de los ratones tratados con los anticuerpos específicos de CLDN6 muMAB 61D y 67A (B).

Figura 23. Efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 64A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con células NEC8 silvestre y células NEC8 con una reducción estable de CLDN6.

Sólo MuMAB 64A y 89A muestran efecto terapéutico en ratones injertados con NEC8 silvestre pero no en ratones injertados con células NEC8 de expresión de CLDN6 reducida, lo que demuestra la especificidad al objetivo de los anticuerpos in vivo.

Figura 24. Mapeo de epítomos de alta resolución de chimMAB 61D, 64A, 67A y 89A.

Los mutantes de alanina se nombran como 'número de residuo silvestre de alanina' o 'número de residuo silvestre de glicina' en el caso de la alanina silvestre, donde los aminoácidos se dan en el código de una sola letra. Los aminoácidos F35, G37, S39 y posiblemente T33 del primer dominio extracelular de CLDN6 son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A. El residuo I40 es esencial para la unión de chimAB 89A y contribuye a la unión de chimAB 61D y 67A. Además, L151 del segundo dominio extracelular de CLDN6 contribuye a la interacción con chimAB 67A. Aunque los experimentos de inmunofluorescencia confirmaron la expresión de los mutantes de CLDN6 P28A, W30A, G49A, L50A, W51A, C54A y C64A, no mostraron tinción de la membrana. Por esta razón, no se excluye la interacción de nuestros anticuerpos con estos aminoácidos. En general, el epítipo identificado en la presente es consistente con nuestra estrategia de inmunización por medio del uso de ADN y péptidos del dominio EC1 de CLDN6.

Figura 25. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos específicos a CLDN6 de la invención.

Las secuencias de CDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) se describen en un recuadro.

Figura 26. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos específicos a CLDN6 de la invención.

Las secuencias CDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) se describen en un recuadro.

Definición de los términos

Para que la presente invención pueda ser más fácilmente comprendida, ciertos términos se definen primero. Definiciones adicionales se muestran a lo largo de la descripción detallada.

A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas indicadas pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la invención (especialmente en el contexto de las

reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra forma en la presente descripción o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado de referencia individual para cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si estos se enumeraran individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o que se contradiga de cualquier otra forma por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionados en la presente descripción pretende ilustrar mejor la invención. De ninguna manera el lenguaje en la descripción se debería interpretar como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para llevar a la práctica la invención.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones fuertes, donde establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembranas que se extienden por la membrana 4 veces con el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, ambos localizados en el citoplasma. El primer bucle extracelular consiste en promedio de 53 aminoácidos y el segundo de alrededor de 24 aminoácidos. CLDN6 y CLDN9 son los miembros de más similitud en la familia CLDN.

El término "CLDN" como se usa en la presente descripción significa claudina e incluye CLDN6, CLDN9, CLDN4 y CLDN3. Preferentemente, un CLDN es un CLDN humano.

El término "CLDN6" se refiere, preferentemente, a la CLDN6 humana, y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 2 o que codifica la secuencia amino de la sec. con núm. de ident.: 8 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 1 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 8. El primer bucle extracelular de CLDN6 comprende, preferentemente, los aminoácidos 28 a 80, con mayor preferencia los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 2 o la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 8, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 7. El segundo bucle extracelular de CLDN6 comprende, preferentemente, los aminoácidos 138 a 160, preferentemente, los aminoácidos 141 a 159, con mayor preferencia los aminoácidos 145 a 157 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 2 o la secuencia de aminoácido de la sec. con núm. de ident.: 8, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 6. Dicho primer y segundo bucles extracelulares forman, preferentemente, la porción extracelular de CLDN6.

El término "CLDN9" se refiere, preferentemente, a CLDN9 humano, y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia amino de la sec. con núm. de ident.: 9 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 9. El primer bucle extracelular de CLDN9 comprende, preferentemente, los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 9. El segundo bucle extracelular de CLDN9 comprende, preferentemente, los aminoácidos 141 a 159 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 9. Dicho primer y segundo bucles extracelulares forman preferentemente la porción extracelular de CLDN9.

El término "CLDN4" se refiere, preferentemente, a CLDN4 humano, y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 10 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 10. El primer bucle extracelular de CLDN4 comprende, preferentemente, los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 10. El segundo bucle extracelular de CLDN4 comprende, preferentemente, los aminoácidos 141 a 159 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 10. Dicho primer y segundo bucles extracelulares forman, preferentemente, la porción extracelular de CLDN4.

El término "CLDN3" se refiere, preferentemente, a CLDN3 humano, y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos la sec. con núm. de ident.: 11 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 11. El primer bucle extracelular de CLDN3 comprende preferentemente los aminoácidos 27 a 75 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 11. El segundo bucle extracelular de CLDN3 comprende, preferentemente, los aminoácidos 140 a 158 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 11. Dicho primer y segundo bucles extracelulares forman, preferentemente, la porción extracelular de CLDN3.

Las secuencias de CLDN descritas anteriormente incluyen cualquiera de las variantes de dichas secuencias, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular las que se presentan de manera natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa identifica frecuentemente numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o

secuencia de aminoácidos dada. El término "CLDN" abarcará (i) variantes de empalme de CLDN, (ii) variantes modificadas postransduccionalmente de CLDN, que incluyen particularmente variantes con diferente glicosilación tal como estado de N-glucosilación, (iii) variantes de conformación de CLDN, (iv) variantes de CLDN relacionadas con el cáncer y no relacionadas con el cáncer. Preferentemente, un CLDN se presenta en su conformación nativa.

5

CLDN6 se ha encontrado que se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de vías biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. Particularmente, CLDN6 es un objetivo preferido para la prevención y/o tratamiento del cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de las vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular, adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, cáncer de teratoma testicular y testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular, un tumor de células germinales del testículo y sus formas metastásicas. En una modalidad, la enfermedad de cáncer asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferentemente, el cáncer de ovario es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferentemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferentemente, es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar. En una modalidad, la célula tumoral asociada con la expresión de CLDN6 es una célula de dicho cáncer.

El término "porción" se refiere a una fracción. Con respecto a una estructura particular tal como una secuencia de aminoácidos o proteína, el término "porción" de la misma puede designar una fracción continua o discontinua de dicha estructura. Preferentemente, una porción de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, preferentemente al menos 40%, preferentemente al menos 50%, con mayor preferencia al menos 60%, con mayor preferencia al menos 70%, incluso con mayor preferencia al menos 80%, y lo con preferencia superlativa al menos 90% de los aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Preferentemente, si la porción es una fracción discontinua, dicha fracción discontinua está compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más partes de una estructura, siendo cada parte un elemento continuo de la estructura. Por ejemplo, una fracción discontinua de una secuencia de aminoácidos puede estar compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más, preferentemente, no más de 4 partes de dicha secuencia de aminoácidos, en donde cada parte comprende, preferentemente, al menos 5 aminoácidos continuos, al menos 10 continuos, preferentemente, al menos 20 aminoácidos continuos, preferentemente al menos 30 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos.

40

Los términos "parte" y "fragmento" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura, preferentemente, comprende una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción, una parte o un fragmento de un epítipo o péptido es, preferentemente, inmunológicamente equivalente al epítipo o péptido del que se deriva.

45

El término "una porción extracelular de un CLDN" en el contexto de la presente invención se refiere a una parte de un CLDN que se enfrenta al espacio extracelular de una célula y que es, preferentemente, accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por anticuerpos localizados externos a la célula. Preferentemente, el término se refiere a uno o más bucles extracelulares o una parte de estos o cualquier otra parte extracelular de un CLDN que es, preferentemente, específico para dicho CLDN. Preferentemente, dicha parte comprende al menos 5, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30, o al menos 50 aminoácidos o más.

50

El término "CLDN asociado con la superficie de una célula" debe entenderse que se refiere al CLDN nativo, es decir, el CLDN en su estado no desnaturalizado, preferentemente en el estado naturalmente plegado. Preferentemente, el término "CLDN asociado con la superficie de una célula" significa que el CLDN se asocia y localiza en la membrana plasmática de dicha célula, en donde al menos una parte de la CLDN, preferentemente la porción extracelular, se enfrenta al espacio extracelular de dicha célula y es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, mediante anticuerpos localizados externos a la célula. La asociación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser por uno o más dominios transmembrana, uno o más anclajes lipídicos, y/o por la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que pueda encontrarse en la capa externa de la membrana plasmática de una célula. Por ejemplo, un CLDN asociado con la superficie de una célula puede ser una proteína transmembrana, es decir, una proteína integral de membrana, que tiene una porción extracelular o puede ser una proteína asociada a la superficie de una célula mediante la interacción con otra proteína que es una proteína de transmembrana.

65

5 CLDN6 se asocia con la superficie de una célula si se localiza en la superficie de dicha célula y es accesible a la unión con los anticuerpos específicos de CLDN6 adicionados a la célula. En modalidades preferidas, una célula que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular es una célula que expresa CLDN6. Debe entenderse que en el caso donde la CLDN6 se expresa por células, la CLDN6 asociada con la superficie de dichas células puede ser solo una porción de la CLDN6 expresada.

El término "una célula que porta una CLDN" significa, preferentemente, que dicha célula porta una CLDN en su superficie, es decir, que la CLDN se asocia con la superficie de dicha célula.

10 "Superficie celular" o "superficie de una célula" se usa de acuerdo con su significado normal en la materia, y por lo tanto, incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por las proteínas y otras moléculas.

15 La expresión "CLDN expresada en la superficie de una célula" significa que la CLDN expresada por una célula se encuentra en asociación con la superficie de dicha célula.

20 De acuerdo con la invención, la CLDN6 no se expresa esencialmente en una célula y no se asocia esencialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y asociación es inferior en comparación con la expresión y asociación en las células de la placenta o tejido de la placenta. Preferentemente, el nivel de expresión y asociación es inferior al 10%, preferentemente, inferior al 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o 0,05% de la expresión y asociación en las células de la placenta o tejido placentario o incluso inferior. Preferentemente, la CLDN6 no se expresa esencialmente en una célula y no se asocia esencialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y asociación excede el nivel de expresión y asociación en el tejido no tumoral, no cancerígeno distinto al tejido placentario en no más de 2 veces, preferentemente, 1,5 veces, y preferentemente, no excede el nivel de expresión y asociación en dicho tejido no tumoral, no cancerígeno. Preferentemente, la CLDN6 no se expresa esencialmente en una célula y no se asocia esencialmente con una superficie celular si el nivel de expresión o asociación está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión o asociación es demasiado bajo para permitir la unión con los anticuerpos específicos a CLDN6 adicionados a las células.

30 De acuerdo con la invención, la CLDN6 se expresa en una célula y se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión y asociación excede el nivel de expresión y asociación en el tejido no tumoral, no cancerígeno distinto del tejido placentario, preferentemente, en más de 2 veces, preferentemente, 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces. Preferentemente, la CLDN6 se expresa en una célula y se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión y asociación está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión y asociación es suficientemente alto para permitir la unión con los anticuerpos específicos a CLDN6 adicionados a las células. Preferentemente, la CLDN6 expresada en una célula se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

40 El término "balsa" se refiere a los microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol localizados en el área de la capa exterior de la membrana plasmática de una célula. La capacidad de ciertas proteínas para asociarse dentro de tales dominios y su capacidad para formar "agregados" o "agregados focales" puede afectar la función de la proteína. Por ejemplo, la translocación de moléculas de CLDN6 en tales estructuras, después de unirse a los anticuerpos de la presente invención, crea una alta densidad de complejos de antígeno CLDN6 anticuerpo en las membranas plasmáticas. Tal alta densidad de complejos antígeno CLDN6 anticuerpo puede permitir la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

45 De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo cáncer, en particular, las formas de cáncer descritas en la presente descripción.

50 "Enfermedades que implican células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por asociación de CLDN6 con su superficie celular" significa de acuerdo con la invención que la expresión y asociación en células de un tejido u órgano enfermo aumenta, preferentemente, en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos 10%, en particular al menos 20%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 500%, al menos 1000%, al menos 10000% o aún más. En una modalidad, la expresión y asociación con la superficie celular solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que en un tejido sano la expresión se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades asociadas con las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular incluyen enfermedades tumorales tales como enfermedades de cáncer. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades tumorales tales como las enfermedades de cáncer son, preferentemente, aquellas en las que las células tumorales o cancerosas expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular.

60 Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumores" o "enfermedad tumorigénica" incluye una enfermedad caracterizada por crecimiento celular, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración regulado aberrantemente, que puede dar como resultado la producción de o tendencia a producir tumores y/o metástasis tumorales. Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento.

5 Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o un tejido que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una pérdida parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser ya sea benigna, premaligna o maligna.

10 Preferentemente, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumor" o "enfermedad tumorigénica" de acuerdo con la invención es una enfermedad cancerosa, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula cancerosa. Preferentemente, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumor" o "enfermedad tumorigénica" se caracteriza por células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular y una célula tumoral expresa CLDN6 y se caracteriza por asociación de CLDN6 con su superficie celular.

15 Una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular es, preferentemente, una célula tumoral o célula cancerosa, preferentemente, de los tumores y cánceres descritos en la presente descripción. Preferentemente, dicha célula es una célula diferente de una célula placentaria.

20 Las enfermedades o cánceres preferidos de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular, carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular, adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular, sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular, carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales incluyendo carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular, adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma del íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinales tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular, un tumor de células germinales del testículo, y sus formas metastásicas.

35 Los principales tipos de cáncer de pulmón son el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Hay tres subtipos principales de carcinomas de pulmón de células no pequeñas: carcinoma de pulmón de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón de células grandes. Los adenocarcinomas representan aproximadamente el 10% de los cánceres de pulmón. Generalmente, este cáncer se observa periféricamente en los pulmones, a diferencia del cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células escamosas, que tienden a tener una localización más central.

40 El cáncer de piel es un crecimiento maligno en la piel. Los cánceres de piel más comunes son el cáncer de células basales, el cáncer de células escamosas y el melanoma. El melanoma maligno es un tipo grave de cáncer de piel. Se debe al crecimiento incontrolado de células pigmentarias, llamadas melanocitos.

45 De acuerdo con la invención, un "carcinoma" es un cáncer que comienza en la capa de revestimiento (células epiteliales) de los órganos.

50 "Carcinoma bronquiolar" es un carcinoma de pulmón, que se cree que se deriva del epitelio de los bronquiolos terminales, en el cual el tejido neoplásico se extiende a lo largo de las paredes alveolares y crece en pequeñas masas dentro de los alvéolos. La mucina puede demostrarse en algunas de las células y en el material en los alvéolos, que incluye, además, las células desprovistas.

55 "Adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido es parte, además, de una categoría de tejido más grande conocido 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 a partir de ectodermo, endodermo y mesodermo. Para clasificarse como adenocarcinoma, las células no necesitan necesariamente formar parte de una glándula, siempre que tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede ocurrir en algunos mamíferos superiores, incluyendo los seres humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que se derivan, mientras que los pobremente diferenciados pueden no serlo. 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 ubicua de las glándulas dentro del cuerpo. Mientras que cada glándula puede no secretar la misma sustancia, siempre que exista una función exocrina para la célula, se considera glandular y su forma maligna se denomina, por lo tanto, adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y, frecuentemente, con tiempo suficiente hacen metástasis. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometrial.

"Cistoadenocarcinoma" es una forma maligna de un tumor epitelial estromal superficial, un tipo de cáncer de ovario.

5 Los tumores estromales epiteliales superficiales son una clase de neoplasmas ováricos que se creen derivados del epitelio superficial ovárico (peritoneo modificado) o del tejido endometrial ectópico o del tubo de Falopio (tubárico). Este grupo de tumores representa la mayoría de todos los tumores de ovario.

10 El teratocarcinoma se refiere a un tumor de células germinales que es una mezcla de teratoma con carcinoma embrionario, o con coriocarcinoma, o con ambos. El coriocarcinoma es un cáncer maligno, trofoblástico y agresivo, generalmente, de la placenta. Se caracteriza por una diseminación hematógena temprana a los pulmones.

15 Un sarcoma es un cáncer del tejido conectivo (hueso, cartílago, grasa) que resulta en la proliferación del mesodermo. Esto está en contraste con los carcinomas, que son de origen epitelial. Un sarcoma sinovial es una forma rara de cáncer que generalmente ocurre cerca de las articulaciones del brazo o la pierna. Es uno de los sarcomas de tejidos blandos.

20 El carcinoma de células renales conocido, además, como cáncer de células renales o adenocarcinoma de células renales es un cáncer de riñón que se origina en el revestimiento del túbulo contorneado proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y eliminan los productos de desecho. El carcinoma de células renales es, considerablemente, el tipo más común de cáncer de riñón en adultos y el más letal de todos los tumores genitourinarios. Los distintos subtipos de carcinoma de células renales son el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilares. El carcinoma de células renales de células claras es la forma más común del carcinoma de células renales. Cuando se observan bajo un microscopio, las células que componen el carcinoma de células renales de células claras aparecen muy pálidas o claras. El carcinoma de células renales papilares es el segundo subtipo más común. Estos cánceres forman pequeñas proyecciones en forma de dedos (denominadas papilas) en algunos, si no en la mayoría, de los tumores.

30 Un tumor de células germinales es una neoplasia derivada de células germinales. Los tumores de células germinales pueden ser tumores cancerosos o no cancerosos. Las células germinales, normalmente, se encuentran dentro de las gónadas (ovario y testículo). Los tumores de células germinales que se originan fuera de las gónadas (por ejemplo, en la cabeza, dentro de la boca, cuello, pelvis, en fetos, bebés y niños pequeños que la mayoría se encuentran frecuentemente en la línea media del cuerpo, particularmente en la punta del cóccix) pueden ser defectos de nacimiento que resultan de errores durante el desarrollo del embrión.

35 Las dos clases principales de tumores de células germinales son los seminomas y los no seminomas, en donde los no seminomas incluyen: teratocarcinoma, carcinoma embrionario, tumores del saco vitelino, coriocarcinoma y teratoma diferenciado. La mayoría de las líneas celulares de los no seminomas son equivalentes a los carcinomas embrionarios, es decir, están compuestos casi en su totalidad por células madre que no se diferencian en condiciones basales, aunque algunas pueden responder a inductores de diferenciación tal como el ácido retinoico.

40 Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de 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 que se transporta por el sangre, la infiltración de los órganos objetivos. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral frecuentemente ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o los componentes del tumor pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y el sistema de ganglios linfáticos regionales.

50 Las células de un tumor secundario o metastásico son como las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que si el cáncer de ovario hace metástasis en el hígado, el tumor secundario se forma por células ováricas anormales, no por células hepáticas anormales. El tumor en el hígado se denomina después cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

55 Por "tratar" se entiende administrar un compuesto o composición como se describe en la presente descripción a un sujeto para prevenir o eliminar una enfermedad, que incluye reducir el tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retrasar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o la gravedad de los síntomas y/o las recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que ha tenido una enfermedad con anterioridad; y/o prolongar, es decir, aumentar la vida útil del sujeto.

60 El término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, retrasar o inhibir la progresión o el empeoramiento, o prevenir o retardar la aparición de una enfermedad o los síntomas de esta.

65 Por "que está en riesgo" se entiende un sujeto, es decir, un paciente, que se identifica que tiene una posibilidad mayor de la normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un

sujeto que ha tenido, o que actualmente tiene, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que tal sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen o han tenido un cáncer tienen, además, un riesgo aumentado de metástasis de cáncer.

5 El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que involucra una reacción inmune específica. En el contexto de la presente invención, los términos tales como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se refieren a la prevención o el tratamiento, o ambos, de la aparición y/o propagación de un tumor en un individuo. El término "inmunoterapia" en el contexto de la presente invención se refiere, preferentemente, a la inmunización contra el tumor activo o vacunación contra el tumor. Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo, una
10 administración profiláctica de la composición de la invención, preferentemente, protege al receptor del desarrollo del crecimiento tumoral. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo, una administración terapéutica de la composición de la invención, puede conducir a la inhibición del progreso/crecimiento del tumor. Esto comprende la desaceleración del progreso/crecimiento del tumor, en particular una interrupción de la progresión del tumor, que conduce, preferentemente, a la eliminación del tumor. Una administración terapéutica de una inmunoterapia puede
15 proteger al individuo, por ejemplo, de la diseminación o metástasis de los tumores existentes.

El término "inmunización" o "vacunación" describe el proceso de administrar el antígeno a un sujeto con el propósito de inducir una respuesta inmune por razones terapéuticas o profilácticas.

20 Los términos "sujeto", "individuo", "organismo" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a vertebrados, preferentemente, mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son seres humanos, primates no humanos, animales domesticados tales como perros, gatos, ovejas, vacuno, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, etc., así como animales en cautiverio, tal como animales de los zoológicos. El término "animal" como se usa en la presente descripción incluye, además, a los
25 seres humanos. El término "sujeto" puede incluir, además, un paciente, es decir, un animal, preferentemente, un ser humano que tiene una enfermedad, preferentemente, una enfermedad asociada con la expresión de CLDN6, preferentemente una enfermedad tumorigénica tal como un cáncer.

El término "adyuvante" se refiere a los compuestos que prolongan o mejoran o aceleran una respuesta inmune. La
30 composición de la presente invención, preferentemente, ejerce su efecto sin la adición de adyuvantes. Aun así, la composición de la presente descripción puede contener cualquier adyuvante conocido. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos tales como emulsiones oleosas (por ejemplo, adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tal como alumbre), productos bacterianos (tal como la toxina de *Bordetella pertussis*), liposomas, y complejos inmunoestimulantes. Los ejemplos de adyuvantes son monofosforil lípido A (MPL SmithKline Beecham). Saponinas
35 tales como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; el documento núm. WO 96/33739), QS7, QS17, QS18, y QS-L1 (So y otros, 1997, Mol. Cells 7: 178-186), adyuvantes incompletos de Freund, adyuvantes completos de Freund, vitamina E, montánido, alumbre, oligonucleótidos CpG (Krieg y otros, 1995, Nature 374: 546-549), y diversas emulsiones de agua en aceite que se preparan a partir de aceites biológicamente degradables tales como escualeno y/o
40 tocoferol.

De acuerdo con la presente enseñanza, una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente invención, en particular una muestra biológica tal como muestra de tejido, incluyendo fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de manera convencional tal como mediante biopsia de tejido, incluyendo biopsia por punción, y tomando sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. De acuerdo con la invención, el
45 término "muestra biológica" incluye, además, fracciones de muestras biológicas.

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 de este. El término "anticuerpo" incluye los anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de estos, que
50 incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de scFv y unidos a antígenos tales como fragmentos Fab y Fab' e incluye, además, todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados, y cualquiera de los fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno y derivados como se describen en la presente descripción. Cada cadena pesada
55 comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente 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 que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal al carboxi terminal 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 los tejidos del huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.
60
65

De acuerdo con la invención, el término "al menos una de las secuencias de CDR" significa, preferentemente, al menos la secuencia de CDR3. El término "secuencias de CDR de una cadena de anticuerpo" se refiere a, preferentemente, CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo.

5 De acuerdo con la invención, una referencia a una cadena de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR particular tal como una secuencia de CDR3 particular significa que dicha secuencia de CDR particular forma ya sea la región CDR tal como la región CDR3 de dicha cadena de anticuerpo, es decir, la región CDR consiste en dicha secuencia de CDR particular, o forma parte de la región CDR tal como la región CDR3 de dicha cadena de anticuerpo, es decir, la región CDR comprende dicha secuencia de CDR particular.

10 Si de acuerdo con la invención se hace referencia a un anticuerpo que comprende una cadena pesada de anticuerpo particular y/o una cadena ligera de anticuerpo particular, tal como una cadena que comprende secuencias de CDR particulares, se prefiere que ambas cadenas pesadas y/o ambas cadenas ligeras del anticuerpo se compongan cada una por la cadena pesada del anticuerpo particular y/o la cadena ligera del anticuerpo particular.

15 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva esencialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura de la inmunoglobulina remanente de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender o bien dominios variables completos fusionados en 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 silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificado para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan 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.

25 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a los anticuerpos en donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento remanente de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada mimetiza las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas por medio del uso de células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos huésped no humanos en combinación con las regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de facilitar la preparación y la fuente no afecta a la especificidad, la región constante que es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.

40 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se demostró que los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión al antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en 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 en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) un dAb que consiste en un VH o un dominio VL, y (viii) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aisladas, 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, se codifican por genes separados, pueden unirse, por medio del uso de métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite que sean fabricados como una simple cadena proteica en la que la regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver por ejemplo, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios pretenden, además, abarcarse dentro del término "porción de unión a 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 se fusiona a un polipéptido de región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante de CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada a la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada a la región constante de CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos de patentes núms. US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Los fragmentos de anticuerpos se obtienen por medio del uso de técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la materia, y los fragmentos se tamizan por utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que se reconoce por el sistema inmune, por ejemplo, que se reconoce por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítomos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que se reconocen por el sistema inmune. En el contexto de la presente invención, el epítopo se deriva, preferentemente, de una proteína CLDN. Los epítomos, por lo general, consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen, por lo general, tener características específicas de estructura tridimensional, así como las características específicas de carga. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítopo de una proteína tal como CLDN comprende, preferentemente, una porción continua o discontinua de dicha proteína y está, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente, entre 5 y 50, con mayor preferencia entre 8 y 30, con preferencia superlativa entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítopo puede tener, preferentemente, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El término "epítopo discontinuo" como se usa en la presente descripción, significa un epítopo conformacional en un antígeno proteico que se forma a partir de al menos dos regiones separadas de la secuencia primaria de la proteína.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. En consecuencia, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a CLDN6, y a otros objetivos, tales como receptores de Fc en las células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" incluye, además, diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una simple cadena polipeptídica, pero por medio del uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando, de ese modo, los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., y otros, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y otros, (1994) Structure 2: 1121-1123).

Como se usa en la presente descripción, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, sus derivados, o regiones de unión al antígeno enlazadas entre sí, al menos dos de las cuales tienen especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluyen una especificidad de unión por un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión por un antígeno o epítopo en una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

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

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítopo particular. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente descripción, 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 estos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca combinatoria, recombinante de anticuerpos y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el empalme de secuencias génicas de la inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", como se usa en la presente descripción, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales, u hongos, que incluyen células de levadura.

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos 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.

Como se usa en la presente descripción, 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 murina es un anticuerpo heterohíbrido.

La enseñanza incluye todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos como se describen en la presente descripción que, para los fines de la invención, se abarcan por el término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpos" 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 la presente descripción están, preferentemente, aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN6, está esencialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN6). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN6 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de CLDN6). Además, un anticuerpo aislado puede estar esencialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a los anticuerpos con diferentes especificidades y que se combinan en una composición bien definida.

De acuerdo con la presente enseñanza, un anticuerpo es capaz de unirse a un objetivo predeterminado si tiene una afinidad significativa por dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar tales como los ensayos descritos en la presente descripción. Preferentemente, un anticuerpo es capaz de unirse a un objetivo si se une de forma detectable a dicho objetivo en un análisis por citometría de flujo (análisis FACS) en donde se determina la unión de dicho anticuerpo a dicho objetivo expresado en la superficie de células intactas. Preferentemente, el anticuerpo se une de forma detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de 10 µg/ml o inferior, 5 µg/ml o inferior o 2 µg/ml o inferior. Preferentemente, el anticuerpo se une de forma detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de 50 nM o inferior, 30 nM o inferior o 15 nM o inferior. La "afinidad" o "afinidad de unión" se mide, frecuentemente, por la constante de disociación de equilibrio (K_D). Preferentemente, 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. Los anticuerpos de la presente invención tienen, preferentemente, valores de EC50 para la unión a CLDN6 de 6500 ng/ml o inferior, 3000 ng/ml o inferior, 2500 ng/ml o inferior, 2000 ng/ml o inferior, 1500 ng/ml o inferior, 1000 ng/ml o inferior, 500 ng/ml o inferior, 400 ng/ml o inferior, 300 ng/ml o inferior, 200 ng/ml o inferior, o 100 ng/ml o inferior.

Un anticuerpo no es (esencialmente) capaz de unirse a un objetivo si no tiene una afinidad significativa por dicho objetivo y no se une significativamente a dicho objetivo con ensayos estándar. Preferentemente, un anticuerpo no es (esencialmente) capaz de unirse a un objetivo si no se une de manera detectable a dicho objetivo en un análisis por citometría de flujo (análisis FACS) en donde se determina la unión de dicho anticuerpo a dicho objetivo expresado en la superficie de células intactas. Preferentemente, el anticuerpo no se une de manera detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de hasta 2 µg/ml, preferentemente, hasta 5 µg/ml, preferentemente, hasta 10 µg/ml, preferentemente, hasta 20 µg/ml, con mayor preferencia hasta 50 µg/ml, en particular hasta 100 µg/ml, o hasta 150 µg/ml, hasta 200 µg/ml o superior. Preferentemente, el anticuerpo no se une de manera detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de hasta 15 nM, preferentemente, hasta 30 nM, preferentemente, hasta 50 nM, preferentemente, hasta 100 nM, preferentemente, hasta 150 nM, o hasta 170 nM, hasta 300 nM, hasta 600 nM, hasta 1000 nM, hasta 1300 nM o superior. Preferentemente, el anticuerpo no se une de forma detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración que satura la unión al objetivo al que se une el anticuerpo, es decir, CLDN6. Preferentemente, un anticuerpo no tiene afinidad significativa por un objetivo 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 mayor que la K_D para unirse al objetivo predeterminado al que el anticuerpo es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un anticuerpo al objetivo al que el anticuerpo es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D para unirse a un objetivo para el que el anticuerpo no tiene afinidad significativa puede ser de al menos 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 es 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 las enseñanzas, un anticuerpo es específico a CLDN6 si es capaz de unirse a CLDN6 pero no es capaz de unirse a otros objetivos, en particular proteínas de claudina distintas de CLDN6 tales como CLDN9, CLDN4, CLDN3 y CLDN1. Preferentemente, un anticuerpo es específico a CLDN6 si la afinidad y la unión a una proteína claudina distinta a CLDN6 tales como CLDN9, CLDN4, CLDN3 y CLDN1 no excede significativamente la afinidad o unión a proteínas no relacionadas a claudina tales como albúmina sérica bovina (BSA), caseína, albúmina sérica humana (HSA) o proteínas transmembrana que no son claudinas, tales como moléculas de MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un anticuerpo es específico a 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 menor que la K_D para unirse a un objetivo para el que no es específico. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un anticuerpo al objetivo para el que es específico es

10^{-7} M, la K_D para unirse a un objetivo para el que no es específico puede ser de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

5 La unión de un anticuerpo a un objetivo puede determinarse experimentalmente por medio del uso de cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky y otros, "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman y Company Nueva York, N Y (1992), y los métodos descritos en la presente descripción. Las afinidades pueden determinarse fácilmente por medio del uso de técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; por medio del uso del instrumento BIAcore 10 2000, por medio del uso de los procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo por medio del uso del antígeno objetivo radiomarcado; o mediante otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard y otros, Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). La afinidad medida de una interacción particular antígeno anticuerpo puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Así, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se preparan, preferentemente, con las soluciones estandarizadas de anticuerpo 15 y antígeno, y un tampón estandarizado.

Una característica única del anticuerpo de la presente invención es la capacidad de unirse a la claudina 6 de la superficie celular. Esto se demuestra mediante análisis por citometría de flujo de las células que expresan la claudina 6.

20 Para probar la unión de anticuerpos monoclonales a las células vivas que expresan las claudinas, puede usarse la citometría de flujo. En resumen, las líneas celulares que expresan claudinas asociadas a la membrana (cultivadas en condiciones de crecimiento estándar) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos en PBS que contiene FCS inactivado por calor al 2% y NaN_3 al 0,1% a 4°C durante 30 minutos. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en las mismas condiciones que la tinción con el anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante FACS por medio del uso de propiedades de dispersión lateral y de luz para bloquear en células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. 25

El término "unión" de acuerdo con la invención, preferentemente, se refiere a una unión específica como se define en la presente descripción. 30

Como se usa en la presente descripción, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de la región constante de cadena pesada.

35 Como se usa en la presente descripción, "conmutación de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

El término "de origen natural" como se usa en la presente descripción como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, es de origen natural una secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo los virus) que pueden aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio. 40

El término "reordenado" como se usa en la presente descripción se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de la cadena pesada o cadena ligera en la que un segmento V está ubicado inmediatamente adyacente a un segmento DJ o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio completo VH o VL, respectivamente. Un locus del gen de la inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado puede identificarse mediante la comparación con el ADN de la línea germinal; un locus redistribuido tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado. 45

El término "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en la presente descripción con respecto a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J. 50

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. Puede emplearse una molécula de ácido nucleico para la introducción en, es decir, la transfección de células, por ejemplo, en forma de ARN que puede prepararse mediante la transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. El ARN puede modificarse, además, antes de la aplicación mediante secuencias estabilizadoras, encapsulado y poliadenuilación. 55

60 Preferentemente, los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la presente enseñanza se han aislado. El término "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la invención que el ácido nucleico fue (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) producido por vía recombinante mediante clonación, (iii) purificado, por ejemplo, mediante escisión y fraccionamiento electroforético en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante. 65

Los ácidos nucleicos pueden presentarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En modalidades preferidas, un ácido nucleico se une funcionalmente a las secuencias control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico, donde el término "homólogo" significa que el ácido nucleico se une funcionalmente, además, a la secuencia control de expresión de forma natural y el término "heterólogo" significa que el ácido nucleico no se une funcionalmente a la secuencia control de expresión de forma natural.

Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia control de expresión están "funcionalmente" unidos entre sí, si se unen covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o la transcripción de dicho ácido nucleico está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia control de la expresión. Si el ácido nucleico debe traducirse en una proteína funcional, entonces, con una secuencia control de la expresión funcionalmente unida a una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia control de la expresión resulta en la transcripción de dicho ácido nucleico, sin causar un cambio de marco en la secuencia codificante o que dicha secuencia codificante no sea capaz de traducirse en la proteína o péptido deseado.

Como se usa en la presente descripción, el término "secuencia control de la expresión" comprende promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o traducción de un ARNm. En modalidades particulares, las secuencias control de la expresión pueden regularse. La estructura exacta de las secuencias control de la expresión puede variar en función de la especie o tipo de célula, pero generalmente comprende las secuencias 5'-sin transcribirse y 5'- y 3'-sin traducirse que están involucradas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como caja TATA, secuencia de encapsulación y secuencia CAAT. Más específicamente, las secuencias control de expresión 5'-sin transcribirse comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias control de la expresión pueden comprender, además, las secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba.

Como se usa en la presente descripción, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se encuentra ubicada corriente arriba (5') de la secuencia de ácido nucleico que se expresa y controla la expresión de la secuencia lo que proporciona un reconocimiento y sitio de unión para la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para otros factores que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Además, un promotor puede ser "inducible" y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutivo" si la transcripción no está controlada por un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o se expresa solo en pequeña medida si está ausente un agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se enciende o se aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

Los promotores que se prefieren incluyen promotores para SP6, T3 y T7 polimerasa, promotor de ARN U6 humano, promotor de CMV y promotores híbridos artificiales de estos (por ejemplo, CMV) donde una parte o partes están fusionadas a una parte o partes de promotores de genes de otras proteínas celulares tales como, por ejemplo, GAPDH humano (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) e incluyendo o no un o unos intrón(es) adicional(es).

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. Además, comprende la expresión parcial de los ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo transitoria o establemente. De acuerdo con la enseñanza, el término expresión incluye, además, una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

"Expresión aberrante" o "expresión anormal" significan, de acuerdo con la presente enseñanza, que la expresión está alterada, preferentemente aumentada, en comparación con una referencia, preferentemente, en comparación con el estado en una célula normal no tumorigénica o un individuo sano. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos 10%, en particular al menos 20%, al menos 50% o al menos 100%. En una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

En una modalidad preferida, de acuerdo con la presente enseñanza, una molécula de ácido nucleico se presenta en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa en la presente en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Los vectores de este tipo preferentemente se replican y/o expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término "plásmido", como se usa en la presente descripción, se refiere en general a un constructo de material genético extracromosómico, generalmente, un ADN dúplex circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

Como vector para la expresión de un anticuerpo, puede usarse ya sea un vector en el que están presentes la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo en diferentes vectores o un tipo de vector en el que la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en el mismo vector.

5 La enseñanza dada en la presente descripción con respecto a secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos específicos, por ejemplo, los que se muestran en el listado de secuencias, se debe interpretar para que, además, se relacionen las modificaciones, es decir, 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 y secuencias de ácidos nucleicos
10 que codifican secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o sostener funciones efectoras de un anticuerpo tal como CDC y/o ADCC. Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo, retiene la unión de dicho anticuerpo al objetivo y, preferentemente, funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente descripción.
15

Similarmente, la enseñanza dada en la presente descripción con respecto a los anticuerpos o hibridomas específicos que producen anticuerpos específicos debe interpretarse de manera que se relacione, además, con anticuerpos caracterizados por una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que se modifica en comparación con
20 la secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico de los anticuerpos específicos pero que son funcionalmente equivalentes. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo, retiene la unión de dicho anticuerpo al objetivo y, preferentemente, las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente descripción, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.
25

Los experimentados en la materia apreciarán que, en particular, las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a un objetivo. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificados en la presente descripción. Por "muy homólogo" se contempla que a partir de 1 a 5, preferentemente, a partir de 1 a 4 tal como 1 a 3 o 1 o 2, sustituciones pueden hacerse en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren una homología sustancial con las regiones de anticuerpos descritos específicamente en la presente descripción.
30

35 Debe entenderse que los ácidos nucleicos específicos descritos en la presente descripción incluyen, además, los ácidos nucleicos modificados con el objetivo de optimizar el uso de codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias en el uso de codones entre organismos pueden conducir a una variedad de problemas relacionados con la expresión de genes heterólogos. La optimización de codones por medio del cambio de uno o más nucleótidos de la secuencia original puede resultar en una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la
40 optimización de la eficacia de traducción, en un huésped homólogo o heterólogo en el que debe expresarse dicho ácido nucleico.

De conformidad con la presente enseñanza, una variante, derivado, forma modificada o fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptido, preferentemente, tiene una propiedad funcional de la secuencia de
45 ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptido, respectivamente de donde se ha derivado. Tales propiedades funcionales comprenden la interacción con o la unión a otras moléculas. En una modalidad, una variante, derivado, forma modificada o fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácido o péptido es inmunológicamente equivalente a la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácido o péptido, respectivamente, de la que se ha derivado.
50

Preferentemente, el grado de identidad entre una secuencia de ácido nucleico específica y una secuencia de ácido nucleico que se modifica con respecto a, o que es una variante de dicha secuencia de ácido nucleico específica será de al menos 70%, preferentemente al menos 75%, con mayor preferencia al menos 80%, aun con mayor preferencia al menos 90% o con preferencia superlativa al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes del ácido nucleico de CLDN6, el grado de identidad se da preferentemente para una región de al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600, o al menos aproximadamente 630 nucleótidos. En modalidades preferidas, el grado de identidad se da para toda la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia, tal como las secuencias de ácido nucleico dadas en la lista de secuencias. Preferentemente, las dos secuencias son capaces de hibridarse y formar un dúplex estable entre sí, siendo la hibridación, preferentemente, llevada a cabo en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook y otros, Editores, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros, Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02 %, NaH₂PO₄ 2,5
65

mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es 0,15 M de cloruro de sodio/0,15 M de citrato de sodio, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava, por ejemplo, en $2 \times$ SSC a temperatura ambiente y después en $0,1-0,5 \times$ SSC/ $0,1 \times$ SDS a temperaturas de hasta 68°C.

5 El término "variante" de acuerdo con la presente enseñanza incluye, además, mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están presentes de forma natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa frecuentemente identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. Para los propósitos de la presente enseñanza, "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína se denominan, además, variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

15 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones del único o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácido en particular. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos que tienen una inserción, uno o más residuos de aminoácidos se insertan en un sitio en particular de una secuencia de aminoácido, aunque es posible también la inserción aleatoria con tamizaje adecuado del producto resultante.

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

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

30 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por al menos un residuo en la secuencia que se elimina y otro residuo que se inserta en su lugar. La preferencia está dada en las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o en el reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios de aminoácidos conservativos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados similarmente. Un cambio conservativo de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácido (aspartato, glutamato); básico (lisina, arginina, histidina); no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y polar no cargado (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

40 Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente, la identidad entre una secuencia de aminoácidos específica y una secuencia de aminoácidos que se modifica con respecto a, o que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos específica tal como entre secuencias de aminoácidos que muestran una homología sustancial será al menos 70%, preferentemente, al menos 80%, aun con mayor preferencia al menos 90% o con preferencia superlativa al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o de identidad se da preferentemente para una región de aminoácido que es al menos 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 al menos aproximadamente 100, de longitud completa 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 de identidad se da preferentemente para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferentemente aminoácidos continuos. Con respecto a las variantes de polipéptido de CLDN6, el grado de similitud o identidad se da preferentemente para una región de al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 200, o al menos aproximadamente 210 aminoácidos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia tal como las secuencias de aminoácidos dadas en la lista de secuencias. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la materia, preferentemente, por medio del uso de la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, por medio del uso de Align, por medio del uso de configuraciones estándar, preferentemente, EMBOSS:: needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

65 "Similitud de secuencias" indica el porcentaje de aminoácidos que son ya sea idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

El "porcentaje de identidad" se obtiene después de la mejor alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente por medio de la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo 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 de 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 por medio de programas de computadora que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula por medio de la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, por medio de la división de este número por el número de posiciones comparadas y por medio de la multiplicación del resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

"Las sustituciones conservativas", pueden realizarse, por ejemplo, sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; (b) los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; (c) los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina, e histidina; y (d) los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones típicamente pueden realizarse dentro de los grupos (a)-(d). Adicionalmente, glicina y prolina se pueden sustituir una por otra basado en su capacidad de alterar α -hélices. Algunas sustituciones preferidas pueden hacerse entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto puede construir fácilmente los ADN que codifican las variantes de aminoácidos conservativos.

La presente enseñanza comprende anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden resultar en una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de Fc γ R y ADCC. Las sustituciones pueden, por ejemplo, hacerse en uno o más de los residuos de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, provocando así una alteración en una función efectora mientras que se retiene la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, cf. documento núm. US 5.624.821 y documento núm. US 5.648.260.

La media vida in vivo de los anticuerpos puede mejorarse por medio de la modificación del epítipo del receptor de rescate del dominio constante de Ig o un dominio constante similar a Ig de manera que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, cf. documento núm. US 6.121.022 y documento núm. US 6.194.551. La media vida in vivo puede aumentarse adicionalmente por medio de la preparación de mutaciones en la región Fc, por ejemplo, por medio de la sustitución de treonina por leucina en la posición 252, por medio de la sustitución de treonina por serina en la posición 254, o por medio de la sustitución de treonina por fenilalanina en la posición 256, cf. documento núm. US 6.277.375.

Además, el patrón de glicosilación de los anticuerpos puede modificarse para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc para mejorar la afinidad de la región Fc por los receptores Fc que, a su vez, resultará en un aumento de la ADCC de los anticuerpos en presencia de células NK, cf. Shield y otros (2002) *JBC*, 277: 26733. Además, puede realizarse la modificación de la galactosilación para modificar el CDC.

Alternativamente, en otra modalidad, las mutaciones pueden introducirse al azar a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación del anticuerpo anti-CLDN6, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CLDN6 modificados resultantes pueden tamizarse por la actividad de unión.

De conformidad con la invención, el término "célula" o "célula huésped" preferentemente, se refiere a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta, preferentemente, es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferentemente, dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye de acuerdo con la invención células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células HEK293, células HELA, células de levadura, y células de insectos). El ácido nucleico exógeno puede encontrarse dentro de la célula (i) libremente dispersado como tal, (ii) incorporado en un vector recombinante, o (iii) integrado en el genoma de la célula huésped o en el ADN mitocondrial. Se prefieren particularmente células de mamífero, tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejidos e incluyen

células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos incluyen queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En modalidades adicionales, la célula es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o macrófago. El término "célula huésped", como se usa en la presente descripción, preferentemente, se pretende que refiera una célula en la que se introdujo un vector de expresión recombinante.

Una célula que comprende una molécula de ácido nucleico preferentemente expresa el péptido o proteína codificada por el ácido nucleico.

Los términos "animal transgénico" se refieren a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente, transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (o integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es, preferentemente, capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y o un transgén humano de cadena pesada o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos humanos anti-CLDN6 cuando se inmuniza con antígeno CLDN6 y/o células que expresan CLDN6. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tales como los ratones HCo7 o HCo12, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento núm. WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLDN6 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) por medio del sometimiento a la recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

"Reducir" o "inhibir" como se usa en la presente descripción significa la capacidad de causar una disminución general, preferentemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, con mayor preferencia de 50% o más, y con preferencia superlativa del 75% o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de proliferación de las células. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

Términos tales como "aumentar" o "mejorar" preferentemente se refieren a un aumento o mejora aproximadamente en al menos un 10%, preferentemente al menos 20%, preferentemente al menos 30%, con mayor preferencia al menos 40%, con mayor preferencia al menos 50%, aun con mayor preferencia al menos 80%, y con preferencia superlativa al menos 100%. Estos términos pueden relacionarse, además, con circunstancias, en donde en el tiempo cero no hay señal detectable para un cierto compuesto o condición y en un intervalo de tiempo particular más tarde que el tiempo cero existe una señal detectable para un cierto compuesto o condición.

El término "inmunológicamente equivalente" significa que la molécula inmunológicamente equivalente tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente exhibe las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunológicas y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo, con respecto al tipo de efecto inmunológico tal como la inducción de una respuesta inmune humoral y/o celular, la intensidad y/o duración de la reacción inmune inducida, o la especificidad de la reacción inmune inducida. En el contexto de la presente invención, el término "inmunológicamente equivalente" se usa preferentemente con respecto a los efectos o propiedades inmunológicas de un péptido o variante de péptido usado para la inmunización. Una propiedad inmunológica particular es la capacidad de unirse a anticuerpos y, cuando sea apropiado, generar una respuesta inmune, preferentemente, por medio de la estimulación de la generación de anticuerpos. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia si dicha secuencia de aminoácidos cuando se expone al sistema inmune de un sujeto induce una reacción inmune, preferentemente anticuerpos, que tiene una especificidad de reacción con la secuencia de aminoácidos de referencia, tal como la secuencia de aminoácidos de referencia que forma parte de CLDN6.

El término "funciones efectoras inmunes" en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmune que resulta en la inhibición del crecimiento del tumor y/o la inhibición del desarrollo del tumor, incluida la inhibición de la diseminación del tumor y metástasis. Preferentemente, las funciones efectoras inmunes resultan en la destrucción de células tumorales. Preferentemente, las funciones efectoras inmunes en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por anticuerpos. Tales funciones comprenden citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado al tumor, por ejemplo, por medio de la unión del anticuerpo a un antígeno de superficie, y/o inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor, preferentemente ADCC y/o CDC. Así, los anticuerpos que son capaces de mediar una o más funciones efectoras inmunes son, preferentemente, capaces de mediar la destrucción de células por medio de la inducción de la lisis mediada por CDC, lisis mediada por ADCC, apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente por medio de la inducción de la lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Los anticuerpos pueden ejercer además, un efecto simplemente por medio de la unión a antígenos asociados a tumores en la superficie de una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado al tumor o inducir la apoptosis simplemente por medio de la unión al antígeno asociado al tumor en la superficie de una célula tumoral.

Descripción detallada de la invención

Mecanismos de acción del mAb

5 Aunque lo siguiente proporciona consideraciones con respecto al mecanismo que subyace a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención, no debe considerarse como limitante de ningún modo para la invención.

10 Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden interactuar con componentes del sistema inmune, preferentemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos de la invención pueden usarse, además, para cargas útiles objetivos (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) o para destruir directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, por medio del ataque a tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas de inmunidad antitumoral que pueden haber sido comprometidas debido a los efectos secundarios citotóxicos de un quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de la invención pueden ejercer además un efecto simplemente por medio de la unión a CLDN6 en la superficie celular, así, por ejemplo, por medio del bloqueo de la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo

20 La ADCC describe la capacidad de destrucción celular de las células efectoras como se describe en la presente descripción, en particular linfocitos, que preferentemente requieren que la célula objetivo se marque por un anticuerpo.

25 La ADCC preferentemente se produce cuando los anticuerpos se unen a antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo activan los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunes. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores de Fc definidos. La ADCC puede verse como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas por el tumor. Preferentemente, la inducción *in vivo* de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas a tumores y respuestas de anticuerpos derivadas de huéspedes.

30 Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 son ambas, además, muy eficaces para dirigir CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo resulta en el descubrimiento de múltiples sitios de unión C1q muy próximos en los dominios C_{H2} de moléculas de anticuerpo participantes tales como moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estos sitios de unión C1q no codificados convierten la interacción C1q-IgG de baja afinidad a una de alta avidéz, lo que desencadena una cascada de eventos que involucran una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de agentes C3a y C5a quimiotácticos/activadores de células efectoras. Preferentemente, 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 hacia y desde la célula.

Producción de anticuerpos

45 Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los 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 por medio del uso de bibliotecas de genes de anticuerpos.

50 El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la materia. Se conocen, además, parentales de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

55 Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y conejo (por ejemplo, se describe en Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), ver, además, Rossi y otros, Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

60 Aún en otra modalidad preferida, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLDN6 por medio del uso 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 descripción como "ratones transgénicos".

La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en el documento núm. WO2004 035607

5 Aún otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de estrategia definida, por ejemplo, ver Babcock y otros, 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Para obtener detalles de la ingeniería de anticuerpos recombinantes consulte, además, 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.

10 Inmunizaciones

15 Para generar anticuerpos contra CLDN6, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con el portador derivados de la secuencia CLDN6, una preparación enriquecida de antígeno CLDN6 expresado de forma recombinante o fragmentos de este y/o células que expresan CLDN6 o fragmentos de estos, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica una CLDN6 humana de longitud completa o fragmentos de esta. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno CLDN6 no resulten en anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse, además, con células que expresan CLDN6, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

20 La respuesta inmune puede controlarse a lo largo del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por vena de la cola o hemorragias retroorbitales. Pueden usarse ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-CLDN6 para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan CLDN6 3-5 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan los anticuerpos específicos.

25 Generación de Hibridomas que producen Anticuerpos Monoclonales

30 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para CLDN6, las células de los nódulos linfáticos o bazos obtenidas de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pocillos individuales pueden después tamizarse por ELISA para hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS por medio del uso de células que expresan CLDN6, pueden identificarse anticuerpos con especificidad para CLDN6. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden volverse a replantar, tamizar de nuevo, y si todavía son positivos para anti-CLDN6, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse in vitro para generar anticuerpos en un medio de cultivo de tejidos para su caracterización.

Generación de Transfectomas que producen Anticuerpos Monoclonales

40 Los anticuerpos de la invención pueden producirse, además, en un transfectoma de célula huésped por medio del uso de, por ejemplo, una combinación de materias de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conocen bien en la materia (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

45 Por ejemplo, en una modalidad, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa por el sistema de expresión del gen GS descrito en el documento núm. WO 87/04462, WO 89/01036 y el documento núm. EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la materia. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células huéspedes eucariotas tales como células CHO, células NS/O, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas como las células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método usado para introducir estos genes puede ser un método descrito en la materia tal como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huéspedes, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que después pueden amplificarse para su nivel de expresión y ampliarse para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes y/o células de cultivo.

55 Alternativamente, los genes del anticuerpo clonado pueden expresarse en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, 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; ver por ejemplo, Verma, R., y otros (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, y otros, (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., y otros (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

60 Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización).

65 a) Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos pueden usarse 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, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La principal inmunogenicidad se media 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 se quimerizan o se humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las 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 cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, como se describe por Kraus y otros, en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una modalidad preferida, se generan anticuerpos quiméricos por medio de la unión de la región constante de la cadena ligera kappa humana con la región variable de la cadena ligera murina. Además, en una modalidad preferida, pueden generarse anticuerpos quiméricos por medio de la unión de la región constante de la cadena ligera lambda humana con la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de la cadena pesada preferidas para la 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.

b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de la complementariedad (las CDR) de las cadenas pesada y ligera. 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 específicos de origen natural por medio de la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico de origen natural injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y otros (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. y otros (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión V (D) J durante la maduración de células B. Las secuencias génicas de la línea germinal diferirán además, de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en el individuo de manera uniforme en toda la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región marco 1 y en la porción carboxi terminal de la región estructural 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (ver el documento núm. WO 99/45962). Las secuencias parciales de cadena pesada y ligera que abarcan las regiones CDR son típicamente suficientes para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables de la línea germinal y de unión contribuyen a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de la línea germinal se usa después para completar las porciones faltantes de las regiones variables. Las secuencias líderes de la cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos, que se solapan y combinan por amplificación mediante PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto de oligonucleótidos sintéticos superpuestos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios óptimos de iniciación de la traducción se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870); y los sitios HindIII se modifican genéticamente corriente arriba de los sitios de iniciación de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, las secuencias de cadena codificantes optimizadas y no codificantes correspondientes se dividen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. Así, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos de doble cadena superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las mezclas se usan después como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de la región variable se dividirá en dos conjuntos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos superpuestos se combinan después mediante amplificación

por PCR para formar la región variable completa. Además, puede ser conveniente incluir un fragmento solapante de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

5 Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan después con
 10 secuencias del promotor clonado, líder, iniciación de la traducción, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y
 terminación de la transcripción para formar construcciones del vector de expresión. Las construcciones de expresión de
 la cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o
 15 transfectarse por separado en células huéspedes que después se fusionan para formar una célula huésped que expresa
 ambas cadenas. Se describen plásmidos para su uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana.
 Los plásmidos pueden construirse de manera que las secuencias de ADNc de la cadena ligera V pesada y V kappa
 amplificadas por PCR puedan usarse para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos
 pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa completamente humanos o quiméricos. Pueden
 20 construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de
 anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Así, en otro aspecto de la presente enseñanza, las características estructurales de los anticuerpos anti-CLDN6 de la
 invención se usan para crear anticuerpos anti-CLDN6 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al
 25 menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como unión a CLDN6. Más específicamente, una
 o más regiones CDR de los anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse de forma recombinante con
 regiones flanqueantes humanas conocidas y las CDR para crear anticuerpos anti-CLDN6 humanizados, modificados
 genéticamente recombinantes adicionales de la invención.

Unión a células que expresan antígeno

25 La capacidad del anticuerpo para unirse a CLDN6 puede determinarse por medio del uso de ensayos de unión
 convencionales, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA, Inmunoelctrotransferencia,
 Inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

30 Aislamiento y caracterización de anticuerpos

Para purificar anticuerpos anti-CLDN6, pueden crecer hibridomas seleccionados en frascos rotativos de dos litros para
 la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, los anticuerpos anti-CLDN6 pueden producirse en
 35 biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la
 cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida puede comprobarse mediante
 electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución tampón puede
 intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 por medio del uso del coeficiente de
 extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden alicuotarse y almacenarse a -80°C.

40 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 seleccionados se unen a epítomos únicos, puede usarse la
 mutagénesis dirigida al sitio o dirigida a múltiples sitios.

Determinación del isotipo

45 Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse los ELISA de isotipos con diversos kits
 comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pocillos de las placas de microtitulación pueden revestirse
 con anti-Ig de ratón. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de
 isotipo purificado, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar ya sea con
 50 sondas conjugadas con peroxidasa específicas a IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, IgA o IgM de ratón. Después del
 lavado, las placas pueden desarrollarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una OD de 405-650.
 Alternativamente, puede usarse el kit de isotipificación de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip (Roche, Núm. de Cat.
 1493027) como lo describe el fabricante.

Análisis citométrico de flujo

55 Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLDN6 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos
 monoclonales a células vivas que expresan CLDN6, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan
 de forma natural o después de la transfección CLDN6 y controles negativos que carecen de expresión de CLDN6
 60 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con varias concentraciones de anticuerpos
 monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene 1% de FBS, y pueden incubarse a 4°C durante 30
 min. Después de lavar, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal
 unido a CLDN6 en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse
 mediante citometría de flujo con un instrumento FACS por medio del uso de propiedades de dispersión lateral y de la luz
 65 para atravesar las células vivas únicas. Para distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de CLDN6 de los
 ligadores no específicos en una sola medición, puede emplearse el método de cotransfección. Las células transfectadas

transitoriamente con plásmidos que codifican CLDN6 y un marcador fluorescente pueden teñirse tal como se describió anteriormente. Las células transfectadas pueden detectarse en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpo. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos a CLDN6 se unen preferentemente 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. Puede usarse un ensayo alternativo por medio del uso de microscopía de fluorescencia, además, o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y pueden examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

10 Microscopía de inmunofluorescencia

Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLDN6 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a las células vivas que expresan CLDN6, puede usarse el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma espontánea o después de la transfección CLDN6 y los controles negativos que carecen de expresión de CLDN6 se cultivan en portaobjetos de cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, complementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 100 µg/ml. Las células pueden fijarse con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratamiento. Las células pueden hacerse reaccionar después con anticuerpos monoclonales contra CLDN6 durante 30 min. a 25°C. Después de lavar, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células pueden examinarse después mediante microscopía de fluorescencia.

Los niveles totales de CLDN6 en las células pueden observarse cuando las células se fijan con metanol o fijan con paraformaldehído y permeabilizan con Triton X-100. En las células vivas y en las células fijadas con paraformaldehído no permeabilizadas, puede examinarse la localización de CLDN6 en la superficie. Adicionalmente, el direccionamiento de CLDN6 hacia las uniones estrechas puede analizarse mediante cotinción con marcadores de unión ajustados tales como ZO-1. Además, pueden examinarse los efectos de la unión del anticuerpo y la localización de CLDN6 dentro de la membrana celular.

30 Inmunoelectrotransferencia

IgG anti-CLDN6 puede probarse, además, para la reactividad con el antígeno CLDN6 mediante inmunoelectrotransferencia. En resumen, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CLDN6 y controles negativos apropiados y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se sondearán con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión de IgG puede detectarse por medio del uso de anti-IgG ratón peroxidasa y desarrollarse con sustrato ECL.

40 Inmunohistoquímica

Las IgG anti-CLDN6 de ratón pueden probarse, además, para la reactividad con el antígeno CLDN6 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, por medio del uso de criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído de tejido no canceroso o muestras de tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan espontáneamente o después de la transfección de CLDN6. Para la inmunotinción, los anticuerpos reactivos a CLDN6 pueden incubarse seguidos por anticuerpos anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) de acuerdo con las instrucciones del vendedor.

50 Actividades fagocíticas y de destrucción celular de anticuerpos in vitro

Además de unirse específicamente a CLDN6, los anticuerpos anti-CLDN6 pueden probarse por su capacidad de mediar en la fagocitosis y la destrucción de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. La prueba de la actividad de anticuerpos monoclonales in vitro proporcionará un tamizaje inicial antes de probar modelos in vivo.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos pueden purificarse mediante centrifugación en densidad Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado por calor o, alternativamente, con 5% de suero humano inactivado por calor y mezclado con células objetivo marcadas con ⁵¹Cr que expresan CLDN6 y que se caracterizan por asociación de CLDN6 con su superficie celular, en diversas relaciones de células efectoras para las células objetivo. Alternativamente, las células objetivo pueden marcarse con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de

Europium con el ligando potenciador que se libera de las células muertas puede medirse con un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células objetivo con luciferasa. El lucifer amarillo añadido puede oxidarse solo por las células viables. Las IgG anti-CLDN6 purificadas pueden después añadirse a varias concentraciones. IgG humana irrelevante puede usarse como control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4 a 20 horas a 37°C dependiendo del tipo de célula efectora usada. Las muestras pueden ensayarse para la citólisis por medio de la medición de la liberación de ⁵¹Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación de lucifer amarillo puede ser una medida de las células viables.

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden analizarse, además, en diversas combinaciones para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden probarse en cuanto a su capacidad para mediar la CDC por medio del uso de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento puede obtenerse de la sangre de una manera conocida por la persona experta. Para determinar la actividad CDC de los mAb, pueden usarse diferentes métodos. La liberación de ⁵¹Cr puede medirse, por ejemplo, o la permeabilidad de membrana elevada puede evaluarse por medio del uso de un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). En resumen, las células objetivo pueden lavarse y pueden incubarse 5×10^5 /ml con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 min. a temperatura ambiente o a 37°C. Después puede agregarse suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células incubarse a 37°C durante 20-30 min. Todas las células de cada muestra pueden agregarse a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo por medio del uso de FACSArray.

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

Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

Para probar la capacidad para iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas a CLDN6 o células tumorales transfectadas con CLDN6 a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden cosecharse, lavarse en tampón de unión a Anexina-V (BD biosciences) e incubarse con Anexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante 15 min. en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (como anteriormente). Alternativamente, puede detectarse una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, núm. de catálogo 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. BrdU incorporado se detecta por medio del uso de anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y se desnaturaliza el ADN con la solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega 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, que utiliza la fluorometría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pocillo.

Estudios preclínicos

Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLDN6 pueden analizarse, además, en un modelo in vivo (por ejemplo, en ratones inmunodeficientes portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLDN6, posiblemente después de la transfección) para determinar su eficacia para controlar el crecimiento de células tumorales que expresan CLDN6.

Estudios in vivo después de xenoinjertar células tumorales que expresan CLDN6 en ratones inmunocomprometidos u otros animales pueden realizarse por medio del uso de anticuerpos de la invención. Los anticuerpos pueden

administrarse a ratones libres de tumor seguido de inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para evitar la formación de tumores o síntomas relacionados con el tumor. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones portadores de tumores para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, la metástasis o los síntomas relacionados con el tumor. 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 la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la posible toxicidad de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por los anticuerpos de la invención, los animales pueden inocularse con anticuerpos o reactivos de control y pueden investigarse exhaustivamente los síntomas posiblemente relacionados con la terapia con anticuerpo CLDN6. Los posibles efectos secundarios de la aplicación in vivo de anticuerpos CLDN6 incluyen particularmente la toxicidad en tejidos que expresan CLDN6, que incluyen la placenta. Los anticuerpos que reconocen CLDN6 en humanos y en otras especies, por ejemplo, ratones, son particularmente útiles para predecir los efectos secundarios potenciales mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales CLDN6 en humanos.

15 Mapeo de epítomos

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

20 I. Moléculas Biespecíficas/Multiespecíficas que se unen a CLDN6

Aún en otra modalidad, los anticuerpos contra CLDN6 pueden derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítomos objetivo. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede enlazarse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

En consecuencia, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para CLDN6 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítomo objetivo. En una modalidad particular, el segundo epítomo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc-gammaRI (CD64) o un receptor Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de célula T, por ejemplo, CD3. Por lo tanto, la enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc-gammaR, Fc-alfaR o Fc-epsilonR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células objetivo que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden dirigirse a células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular a células efectoras y pueden desencadenar actividades de células efectoras mediadas por receptor de Fc, tales como fagocitosis de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por asociación de CLDN6 con su superficie celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden incluir, además, una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CLDN6. En una modalidad, la tercera especificidad de unión es una porción del anti-factor de potenciación (EF), por ejemplo una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y de ese modo aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor anti-potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de ese modo resulta en una mejora del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de la célula objetivo. La "porción de factor anti-potenciación" puede unir un receptor de Fc o un antígeno de célula objetivo. Alternativamente, la porción del factor anti-potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la porción del factor anti-potenciación puede unir una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune aumentada contra la célula objetivo).

En una modalidad, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, que incluyen, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o una cadena simple de Fv. El anticuerpo puede ser además un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo de este tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner y otros, documento núm. US 4.946.778. El anticuerpo puede ser, además, una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión como se describe en el documento núm. US2003/0118592 y documento núm. US 2003/0133939.

En una modalidad, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas comprenden una especificidad de unión para un Fc-gammaR o un Fc-alfaR presente en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión para un antígeno de célula objetivo, por ejemplo, CLDN6.

5 En una modalidad, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no se bloquea por inmunoglobulina G humana (IgG). Como se usa en la presente descripción, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptores transmembrana o solubles que se agrupan en tres clases de receptores de Fc-gamma: Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32), y Fc-gammaRIII (CD16). En una modalidad preferida, el receptor Fc-gamma es un Fc-gammaRI humano de alta afinidad.

10 Todavía en otras modalidades preferidas, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), cuya unión preferentemente no se bloquea por la inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen alfa (Fc-alfaRI) localizado en el cromosoma 19. Se conoce que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc-alfaRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc-alfaRI tiene una afinidad media tanto para IgA1 como IgA2, que se aumenta tras la exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H. C. y otros (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc-alfaRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R. C. y otros (1992) *J.Immunol.* 148: 1764).

20 En otra modalidad, la molécula biespecífica se comprende por dos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención que tienen actividades funcionales complementarias, tales como un anticuerpo que funciona predominantemente por medio de la inducción de CDC y el otro anticuerpo que funciona predominantemente por medio de la inducción de la apoptosis.

25 Un "anticuerpo específico de la célula efectora" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor Fc de las células efectoras. Los anticuerpos preferidos para usar en la presente invención se unen al receptor Fc de las células efectoras en un sitio que no se une a la inmunoglobulina endógena.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que se implica en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ilustrativas incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En modalidades preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR se implican en la destrucción específica de células objetivo y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmune, o se unen a células que presentan antígenos. En otras modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo, célula objetivo o microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de Fc-gammaRI se regula positivamente por interferón gamma (IFN- γ). Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de las células que portan Fc-gammaRI contra los objetivos. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

45 "Célula objetivo" significará cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) que pueda dirigirse por un anticuerpo de la invención. En modalidades preferidas, la célula objetivo es una célula que expresa o sobreexpresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular típicamente incluyen células tumorales.

II. Inmunoconjugados

55 En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-CLDN6 conjugado con una porción o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Los conjugados de este tipo se denominan en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial para y, en particular destruya las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y sus análogos u homólogos.

65 Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la invención incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fluradabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y

5 lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y el platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una modalidad preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un inmunosupresor. Aun en otra modalidad, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse, además, con un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CLDN6, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpos pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la porción del fármaco no debe interpretarse como limitado para agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción 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 su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como 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 de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

20 Las técnicas para la conjugación de tales porciones terapéuticas con anticuerpos se conocen bien, ver, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y otros (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2da Ed.)*, Robinson y otros (eds.), págs. 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 y otros (eds.), págs. 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 y otros (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y otros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

30 En una modalidad adicional, los anticuerpos de acuerdo con la invención se unen a un enlazador quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

III. Composiciones Farmacéuticas

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene uno o una combinación de anticuerpos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19na Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En una modalidad, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la invención que actúan por diferentes mecanismos, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente por medio de la inducción de CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente por medio de la inducción de la apoptosis.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, además, solas o en terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos un agente antiinflamatorio o al menos un agente inmunosupresor. En una modalidad, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un NSAID (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), los NSAID tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenopropeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolaco (Lodine), oxapropina (Daypro) e indometacina (Indocin).

55 En otra modalidad, tales agentes terapéuticos incluyen agentes que conducen al agotamiento o a la inactivación funcional de células T reguladoras tales como ciclofosfamida a dosis baja, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-IL2 o anti receptor de IL2.

60 Aun en otra modalidad, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como derivados de Taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluoruracilo, doxorubicina (Adriamicina), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar). En otra modalidad, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferentemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que padecen cáncer, por ejemplo, los tipos de cáncer como se describen en la presente descripción.

65 Aun en otra modalidad, los anticuerpos de la invención pueden administrarse junto con radioterapia y/o trasplante de células madre periféricas autólogas o de médula ósea.

5 Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo., por inyección o infusión). En dependencia de la vía de administración, el compuesto activo, por ejemplo, anticuerpo, molécula biespecífica o multiespecífica, puede revestirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

10 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (ver por ejemplo, Berge, S. M., y otros (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

15 Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición básicas. Las sales de adición ácidas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, así como también a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílico alifáticos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Las sales de adición básicas incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina y procaína.

20 Una composición de la invención puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la materia. Como se apreciará por el experto en el arte, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la materia. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

25 Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario revestir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador adecuado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen las soluciones salina y de tampón acuoso. Los liposomas incluyen las emulsiones agua en aceite en agua CGF, así como liposomas convencionales (Strejan y otros (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

30 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

35 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contiene por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse por la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

40 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse por medio de la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con microfiltración.

45 Generalmente, las dispersiones se preparan por medio de la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de éste.

65

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo se puede administrar varias dosis divididas pueden administrarse en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias de los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio y sulfito de sodio; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil gailato y alfatocoferol; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y se puede preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la materia de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará en dependencia del sujeto que se trata, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal incluyen además formulaciones de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosol que contienen tales portadores que se conocen en la materia como adecuados. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones, o propelentes que se puedan requerir.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usa en la presente se refiere a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitarse a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal e infusión.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por medio del uso de surfactantes.

Estas composiciones pueden contener, además, adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionante y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antifúngicos antibacterianos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico. Además, puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares y cloruro de sodio en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede efectuar por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente que se tratar y factores similares bien conocidos en la materia médica.

Un médico o veterinario de experiencia ordinaria en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Generalmente, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será la cantidad del compuesto que es la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Es preferente que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrado proximal al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria efectiva de la composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas separadas en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Mientras es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

En una modalidad, los anticuerpos de la invención pueden administrarse por infusión, preferentemente infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración puede realizarse, además, por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, como de 2 a 12 horas. Tal régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 circulantes tras la administración en una muestra biológica por medio del uso de anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-CLDN6.

Aun en otra modalidad, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

Todavía en otra modalidad, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra CLDN6 seguido de una infusión de un anticuerpo contra CLDN6 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días más tarde.

En una modalidad, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas. En una modalidad más preferida, los liposomas incluyen una porción de direccionamiento. En una modalidad más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran por inyección en bolo a un sitio proximal al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos tales como bacteria y hongos.

En una modalidad adicional, los anticuerpos de la invención pueden formularse para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto puede hacerse mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante la PEGilación de los anticuerpos o por medio del uso de fragmentos F(ab)₂'. Pueden hacerse referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistencia a la degradación enzimática. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; y en "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral puede medirse por respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (CR) se define como ninguna evidencia clínica, radiológica u otra evidencia de enfermedad. Una respuesta parcial (PR) resulta de una reducción en el tamaño total del tumor de más del 50%. El tiempo medio de progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral puede medirse, además, por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal de eficacia predictiva en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse por medio de la examinación de la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o apoptosis por ensayos in vitro conocidos por el experto. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de cualquier otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría determinar tales cantidades basado en los factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición pueda entregarse con una jeringa. Además del agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede producirse por medio de la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo se protege adecuadamente, como se describió anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

5 IV. Usos y métodos de la invención

10 Los anticuerpos (que incluyen inmunoconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados descritos en la presente descripción) de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que implican células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, in vitro o ex vivo, o a sujetos humanos, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una diversidad de trastornos tales como los descritos en la presente descripción. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse destruyendo células enfermas, en particular células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de CLDN6 y/o un patrón alterado de asociación de CLDN6 con su superficie celular en comparación con células normales.

20 Por ejemplo, en una modalidad, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse abarcan todos los cánceres que expresan CLDN6 y las entidades tumorales que incluyen las descritas en la presente descripción.

25 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la invención pueden usarse, además, para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente descripción.

30 En otra modalidad, los anticuerpos de la invención se pueden usar para detectar niveles de CLDN6 o formas particulares de CLDN6, o niveles de células que contienen CLDN6 en su superficie de membrana, niveles que pueden vincularse a ciertas enfermedades o síntomas de la enfermedad tales como se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para reducir o interactuar con la función de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, por medio de la implicación de este modo de estas células como importantes mediadores de la enfermedad. Esto puede lograrse por medio del contacto de una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CLDN6 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CLDN6. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CLDN6 se detecta y se compara en la muestra y una muestra de control, es decir, una muestra de referencia.

35 Los anticuerpos de la invención pueden probarse inicialmente por su actividad de unión asociada con usos terapéuticos o de diagnóstico in vitro. Por ejemplo, los anticuerpos pueden probarse por medio del uso de ensayos de citometría de flujo como se describe en la presente descripción.

40 Los anticuerpos de la invención pueden usarse para provocar in vivo o in vitro una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o diferenciación de una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular; destruir una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por asociación de CLDN6 con su superficie celular; mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en presencia de células efectoras; mediar la CDC de una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en presencia de complemento; mediar la apoptosis de una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular; inducir la adhesión homotípica; y/o inducir la translocación en balsas lipídicas tras la unión de CLDN6.

50 En una modalidad particular, los anticuerpos se usan in vivo o in vitro para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con CLDN6. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con CLDN6 incluyen, entre otros, cánceres tales como los descritos en la presente descripción.

55 Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-CLDN6 de la invención pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, agente antiangiogénico o agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunitarias contra los anticuerpos de la invención. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los enumerados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-CLDN6 de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales. Tal coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los haría no reactivos con el anticuerpo.

65

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que se unen al complemento, además, pueden usarse en presencia de complemento. En una modalidad, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprenden células objetivo con un agente de unión de la invención y células efectoras apropiadas puede complementarse mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de células objetivo revestidas con un agente de unión de la invención puede mejorarse por medio de la unión de proteínas del complemento. En otra modalidad, las células objetivo revestidas con las composiciones de la invención pueden lisarse además por el complemento. Aun en otra modalidad, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones de la invención pueden administrarse, además, junto con el complemento. En consecuencia, dentro del alcance de la invención se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas porque el complemento se localiza muy cerca de los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero pueden administrarse por separado. La unión de las composiciones de la presente invención a células objetivo puede provocar la translocación del complejo antígeno-anticuerpo CLDN6 en balsas lipídicas de la membrana celular. Tal translocación crea una alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo que pueden activar y/o potenciar eficientemente la CDC.

Además están dentro del alcance de la presente invención los kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria).

En consecuencia, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden administrarse adicionalmente (antes, de manera simultánea o después de la administración de un anticuerpo de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos de la invención.

En otras modalidades, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de receptores Fc-gamma o Fc-alfa, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citocinas preferidas incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otros agentes importantes para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción son los β -glucanos que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificada y se producen por una variedad de plantas y microorganismos, por ejemplo, bacterias, algas, hongos, levaduras y granos. Pueden usarse además, fragmentos de β -glucanos producidos por organismos. Preferentemente, el β -glucano es un polímero de $\beta(1,3)$ glucosa en donde al menos algunas de las unidades de glucosa de la cadena principal, por ejemplo 3-6% de las unidades de glucosa de la cadena principal, poseen ramas tales como ramificaciones $\beta(1,6)$.

En una modalidad particular, la enseñanza abarca métodos para detectar la presencia de antígeno CLDN6 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CLDN6, que comprende contactar la muestra, y una muestra control, con un anticuerpo que se une específicamente a CLDN6, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte de este y CLDN6. Se detecta después la formación de un complejo, en donde una diferencia de la formación de complejo entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno CLDN6 en la muestra.

Todavía en otra modalidad, la enseñanza abarca un método para detectar la presencia o cuantificación de la cantidad de células que expresan CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular in vivo o in vitro. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición de la invención conjugada con un marcador detectable; y (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular.

Los métodos descritos anteriormente son útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con CLDN6 y/o la localización de enfermedades relacionadas con CLDN6 tales como enfermedades de cáncer. Preferentemente, una cantidad de CLDN6 en una muestra que es superior que la cantidad de CLDN6 en una muestra de control es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con CLDN6 en un sujeto, en particular un ser humano, del que se deriva la muestra.

Cuando se usa en los métodos como los descritos anteriormente, un anticuerpo descrito en la presente descripción puede proporcionarse con una etiqueta que funcione para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda etiqueta, por ejemplo FRET

(Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, por carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporcionar una porción de captura, por ejemplo, afinidad, anticuerpo/antígeno o formación de complejos iónica. Son adecuadas como etiqueta las estructuras, como etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas cromóforos, etiquetas radioisotópicas, etiquetas isotópicas, preferentemente etiquetas isotópicas estables, etiquetas isobáricas, etiquetas enzimáticas, etiquetas de partículas, en particular etiquetas de partículas metálicas, etiquetas de partículas magnéticas, etiquetas de partículas de polímero, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lectinas, secuencias de etiquetas que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse por medio del uso de agentes de unión, etc. Las etiquetas comprenden, de forma no limitativa, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido yopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y radiodiagnóstico, que incluyen los emisores de positrones tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nucleidos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

Aun en otra modalidad, los inmunocnjugados de la invención pueden usarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen CLDN6 asociado a su superficie por medio de la unión de tales compuestos al anticuerpo. Así, la invención proporciona, además, métodos para localizar células ex vivo o in vitro que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular, tales como células tumorales circulantes.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Las técnicas y métodos usados en la presente descripción se describen en la presente descripción o se llevan a cabo de una manera conocida per se y como se describe, por ejemplo, en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Todos los métodos que incluyen el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante a menos que se indique específicamente.

Ejemplo 1: Cuantificación de la expresión de CLDN6 en tejidos normales, tejidos cancerosos y líneas celulares por medio del uso de RT-PCR en tiempo real

El ARN celular total se extrajo de muestras de tejido congelado y líneas celulares de cáncer por medio del uso de RNeasy Mini Kit (Qiagen), se preparó con un oligonucleótido dT₁₈ y se transcribió de forma inversa con Superscript II (GIBCO/Lifetech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ADNc obtenido se probó por amplificación de transcritos de p53 en una PCR de 30 ciclos. Después de la normalización a HPRT, la expresión de CLDN6 se cuantificó por medio del uso del cálculo de $\Delta\Delta CT$.

Se probaron tejidos de tres individuos para cada tipo de tejido normal. Solo se pudieron detectar cantidades mínimas de transcritos de CLDN6 en tejidos normales después de 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedió ligeramente el límite de expresión fue la placenta.

A diferencia de los tejidos normales, encontramos una alta expresión de CLDN6 en muestras de cáncer de ovario (adenocarcinomas), cáncer de pulmón (NSCLC, con la máxima frecuencia y niveles de expresión en adenocarcinomas), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel (carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas), melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello (adenoma pleomórfico maligno), sarcoma (sarcoma sinovial y carcinosarcoma), cáncer de vías biliares, cáncer de células renales (carcinoma de células claras y carcinoma papilar), cáncer de útero y líneas celulares de cáncer A2780 (cáncer de ovario), NIH-OVCAR3 (cáncer de ovario), HCT-116 (cáncer de colon), EFO-27 (cáncer de ovario), CPC-N (SCLC), NCI-H552 (NSCLC), SNU-1 (cáncer gástrico), KATOIII (cáncer gástrico), YAPC (cáncer de páncreas), AGS (cáncer gástrico), FU97 (cáncer gástrico), MKN7 (cáncer gástrico).

Ejemplo 2: Cuantificación de la expresión de CLDN6 en tejidos normales, tejidos cancerosos y líneas celulares por medio del uso de análisis de inmunoelectrotransferencia

Para el análisis de inmunoelectrotransferencia se usaron 20 μ g de proteína total extraída de células lisadas con tampón de lisis de Laemmli. Los extractos se diluyeron en tampón de muestra reductora (Roth), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransferieron sobre membrana de PVDF (Pall). La inmunotinción se realizó con anticuerpos policlonales reactivos a CLDN6 (ARP) y beta-actina (Abcam) seguido por la detección de anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios de cabra anti ratón y de cabra anti conejo, conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako).

Se probaron lisados tisulares de hasta cinco individuos para cada tipo de tejido normal. No se detectó expresión de la proteína CLDN6 en ninguno de los tejidos normales analizados. A diferencia de los tejidos normales, se detectó alta

expresión de la proteína CLDN6 en muestras de cáncer de ovario y cáncer de pulmón. La expresión de CLDN6 se detectó en NIH-OVCAR3 (cáncer de ovario), MKN7 (cáncer gástrico), AGS (cáncer gástrico), CPC-N (SCLC), HCT-116 (cáncer de colon), FU97 (cáncer gástrico), NEC8 (testicular carcinoma embrionario), JAR (coriocarcinoma placentario), JEG3 (coriocarcinoma placentario), BEWO (coriocarcinoma placentario) y PA-1 (teratocarcinoma de ovario).

5

Ejemplo 3: Análisis inmunohistoquímico (IHC) de la expresión de CLDN6 en tejidos normales y tejidos cancerosos

10

15

20

Secciones de tejido embebidas en parafina (4 μ m) se incubaron durante 1 hora a 58°C en una placa de calentamiento (HI 1220, Leica). Se eliminó la parafina de las secciones por medio de la incubación los portaobjetos en Roticlear (Roth) durante 2 x 10 min a RT. Posteriormente, las secciones se rehidrataron en alcohol graduado (99%, 2 x 96%, 80% y 70%, 5 min cada una). La recuperación del antígeno se realizó por medio del calentamiento de los portaobjetos a 120°C (15 psi) durante 15 min en 10 mM de tampón de citrato (pH 6,0) + Tween-20 al 0,05%. Directamente después de calentar los portaobjetos se incubaron en PBS durante 5 min. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 0,3% en MeOH durante 15 min a temperatura ambiente. Para evitar la unión no específica, los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 min a RT. A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo policlonal específico a CLDN6 (1 μ g/ml) (ARP) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron con PBS a RT (3 x 5 min) y se incubaron con 100 μ l de anticuerpos secundarios (PowerVision poli Anti-IgG de Conejo conjugado con HRP listo para usar (ImmunoLogic)) durante una hora a RT. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con PBS a RT (3 x 5 min). La tinción final se realizó por medio del uso del estuche de sustrato VECTOR NovaRED SK-4800 de Vector Laboratories (Burlingame). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 90 s. a RT. Después de la deshidratación con alcohol graduado (70%, 80%, 2x 96% y 99%, 5 min cada uno) y 10 min de incubación en portaobjetos de xilol se montaron con X-tra Kit (Mediate Histotechnic).

25

30

No se detectó expresión de proteína CLDN6 en tejidos normales de pulmón, ovario, estómago, colon, páncreas, hígado, duodeno o riñón. A diferencia de los tejidos normales, se observó tinción fuerte o al menos significativa en secciones de tejido de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales), cáncer de cuello uterino, cáncer testicular (seminoma) y cáncer de útero. La tinción se acentuó claramente en la membrana plasmática de las poblaciones de células epiteliales malignas, mientras que las células epiteliales estromales y no malignas adyacentes fueron negativas. Estos resultados indican que la proteína CLDN6 se localiza en la membrana plasmática de las células malignas.

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos murinos contra CLDN6

35

a. Generación de vectores de expresión que codifican fragmentos de CLDN6 y CLDN6 de longitud completa

40

Se preparó una secuencia de ADN no natural optimizada por codones (sec. con núm. de ident.: 3) que codifica CLDN6 de longitud completa (número de acceso NCBI NP_067018.2, sec. con núm. de ident.: 2) por síntesis química (GENEART AG, Alemania) y se clonó en el vector pcDNA3.1/*myc*-His (Invitrogen, EE. UU.) lo que produce el vector p3953. La inserción de un codón de parada permitió la expresión de la proteína CLDN6 sin fusionarse con el vector codificado con la etiqueta *myc*-His. La expresión de CLDN6 se probó mediante análisis de inmunoelectrotransferencia, citometría de flujo e inmunofluorescencia por medio del uso de anticuerpos anti-CLDN6 comercialmente disponibles (ARP, 01-8865; R&D Systems, MAB3656).

45

50

Además, una secuencia de ADN optimizada por codones (sec. con núm. de ident.: 4) que codifica el fragmento putativo del dominio extracelular 2 (EC2) de CLDN6 (sec. con núm. de ident.: 6) como una fusión con un N-terminal del líder de Ig kappa derivado de péptido señal seguido por 4 aminoácidos adicionales para asegurar que se preparó un correcto sitio de escisión de peptidasa de señal (sec. con núm. de ident.: 5) y se clonó en el vector pcDNA3.1/*myc*-His lo que produce el vector p3974. Antes de la inmunización, se confirmó la expresión del fragmento EC2 mediante microscopía de inmunofluorescencia en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente y fijadas en paraformaldehído (PFA) por medio del uso de un anticuerpo anti-*myc* disponible comercialmente (Cell Signaling, MAB 2276).

b. Generación de líneas celulares que expresan establemente CLDN6

55

Las líneas celulares HEK293 y P3X63Ag8U.1 que expresan establemente CLDN6 se generaron mediante técnicas estándar por medio del uso del vector p3953.

c. Inmunizaciones

60

65

Ratones Balb/c se inmunizaron con 25 μ g de ADN plasmídico p3974 junto con 4 μ l de PEI-manosa (PEI-Man; in vivo-jetPEI™-Man de PolyPlus Transfection) (PEI-Man 150 mM en H₂O con glucosa al 5%) mediante inyección intraperitoneal en los días 0, 16 y 36. En los días 48 y 62 se inmunizaron ratones mediante inyección intraperitoneal con células de mieloma P3X63Ag8U.1 transfectadas con el vector p3953 para expresar de manera estable la CLDN6. Las células administradas el día 62 se irradiaron con 3000 rad antes de la inyección. Se controló la presencia de anticuerpos dirigidos a CLDN6 en sueros de ratones mediante microscopía de inmunofluorescencia entre los días 20 y 70 por medio del uso de células CHO-K1 cotransfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN6 y GFP. Con esta finalidad, 24 h

después de la transfección, las células fijadas o no fijadas con PFA se incubaron con una dilución 1:100 de sueros de ratones inmunizados durante 45 min a temperatura ambiente (RT). Las células se lavaron, incubaron con un anticuerpo anti Ig de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) y se sometieron a microscopía de fluorescencia.

5 Se detectaron los anticuerpos específicos anti-CLDN6 en muestras de suero obtenidas de un ratón sobre la base que se produjo el hibridoma F3-6C3-H8; ver Fig. 2.

10 Para la generación de anticuerpos monoclonales, los ratones con respuestas inmunes anti-CLDN6 detectables se reforzaron cuatro días antes de la esplenectomía mediante inyección intraperitoneal de 2×10^7 células de HEK293 establemente transfectadas con el vector p3953.

d. Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales murinos contra CLDN6

15 6×10^7 esplenocitos aislados de un ratón inmunizado se fusionaron con 3×10^7 células de la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) por medio del uso de PEG 1500 (Roche, CRL 10783641001). Las células se sembraron a aproximadamente 5×10^4 células por pocillo en placas de microtitulación de fondo plano y se cultivaron durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo RPMI que contenía suero fetal bovino inactivado por calor al 10%, fusión de hibridoma al 1% y suplemento de clonación (HFCS, Roche, CRL 11363735), HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, glucosa al 4,5%, 2-mercaptoethanol 0,1 mM, 1 x penicilina/estreptomicina y 1 x suplemento HAT (Invitrogen, CRL 21060). Después de 10 a 14 días, los pocillos individuales se tamizaron por citometría de flujo para anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Los hibridomas que secretan anticuerpos se subclonaron mediante dilución limitante y se probaron de nuevo para los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Los subclones estables se cultivaron para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo tisular para su caracterización. Se seleccionó al menos un clon de cada hibridoma que retuvo la reactividad de las células parentales (probado por citometría de flujo). Se generaron bancos de células de nueve viales para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 5: Características de unión de los sobrenadantes de hibridoma y anticuerpos monoclonales

30 a. Control de calidad de células HEK293T transfectadas transitoriamente mediante (i) inmunoelectrotransferencia y (ii) análisis por citometría de flujo

(i) Las células HEK293T se transfectaron con ácidos nucleicos que codifican CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o se transfectaron de manera simulada. La expresión de CLDN3, CLDN4, CLDN6 o CLDN9 en las células HEK293T se determinó por inmunoelectrotransferencia. Con esta finalidad, las células se cosecharon 24 horas después de la transfección y se sometieron a lisis. El lisado se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se tiñó con los anticuerpos anti-CLDN3(A) (Invitrogen, 34-1700), anti-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), anti-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) o anticuerpos anti-CLDN9(A) (Santa Cruz sc-17672) que se unen específicamente al C terminal de la claudina correspondiente en condiciones desnaturalizantes. Después de la incubación con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y el desarrollo con reactivo ECL, se usó un dispositivo de imágenes LAS-3000 (Fuji) para la visualización. Se observaron bandas de los pesos moleculares esperados de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, sólo en las células transfectadas pero no en las células control (Fig. 3), lo que demuestra que las células HEK293T no expresan endógenamente ninguna de las claudinas investigadas y por lo tanto, son una herramienta adecuada para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos CLDN6.

40 (ii) Las células HEK293T de (i) se analizaron adicionalmente por citometría de flujo por medio del uso de anticuerpos anti-CLDN que reconocen epítomos nativos (IgG2a de ratón anti-CLDN3 (R&D, MAB4620), IgG2a de ratón anti-CLDN4 (R&D, MAB4219), IgG2b de ratón anti-CLDN6 (R&D, MAB3656)). Los anticuerpos obtenibles de Sigma con los números de producto M9144 y M8894 sirvieron como controles de isotipo. La especificidad de estos anticuerpos anti-CLDN se analizó por medio del uso de células HEK293T transitoriamente transfectadas con ácidos nucleicos que codifican CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente. El anticuerpo anti-CLDN6 muestra reactividad cruzada con CLDN3, CLDN4 y CLDN9. El anticuerpo anti-CLDN4 muestra reactividad cruzada con CLDN3, CLDN6 y CLDN9. El anticuerpo anti-CLDN3 se une específicamente a CLDN3 (Fig. 4).

b. Determinación de la especificidad de anticuerpos monoclonales producidos de acuerdo con la invención por medio del uso de citometría de flujo

55 Las células HEK293T se cotransfectaron con un vector que codifica diferentes proteínas CLDN y un vector que codifica un marcador de fluorescencia. 24 h después de la transfección, las células se recogieron por medio del uso de solución de tripsina/EDTA al 0,05% y se lavaron con tampón FACS (PBS que contiene FCS al 2% y azida sódica al 0,1%). Las células se transfirieron a las placas de microtitulación de fondo en U a 2×10^5 células por pocillo y se incubaron durante 60 minutos a 4°C con sobrenadantes de hibridoma. Tras el lavado tres veces con tampón FACS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario específico anti- IgG 1+2a+2b+3 de ratón conjugado con alofococianina (APC) (Dianova, 115-135-164). A continuación, las células se lavaron dos veces y la unión se evaluó por citometría de flujo por medio del uso de una matriz BD FACS (Fig. 5). La expresión del marcador de fluorescencia se traza en el eje horizontal contra la unión del anticuerpo en el eje vertical. Un anticuerpo IgG2b de ratón anti-CLDN6 comercialmente disponible (R&D, MAB3656) sirvió como control positivo y el anticuerpo obtenible de Sigma con el número de producto M8894 sirvió como control de isotipo.

Anticuerpos en los sobrenadantes de los subclones de hibridoma monoclonal F3-6C3-H2, F3-6C3-H8, F3-6C3-H9, F3-6C3-D8 y F3-6C3-G4, todos derivados del hibridoma F3-6C3, fueron específicos para CLDN6 y no se unieron a CLDN9, CLDN3 y CLDN4. La Fig. 5A muestra, de forma ilustrativa, los resultados para el subclón de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8. Los anticuerpos en el sobrenadante del subclón de hibridoma monoclonal F3-6C3-H8 se unen, además, a las células transfectadas con la variante (I143V)-SNP de CLDN6. Los anticuerpos en el sobrenadante del subclón de hibridoma monoclonal F4-4F7-F2 se unen tanto a CLDN6 como a CLDN9 (Fig. 5A). Anticuerpos en el sobrenadante del subclón de hibridoma monoclonal F3-7B3-B4 se unen a CLDN6, CLDN3 y CLDN9 (Fig. 5B). Los anticuerpos en el sobrenadante del subclón de hibridoma monoclonal F3-3F7-A5 se unen a CLDN6, CLDN4 y CLDN9 (Fig. 5B).

Ejemplo 6: Generación y prueba de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

a. Generación de vectores de expresión que codifican el dominio extracelular 1 de CLDN6

Una secuencia de ADN optimizada por codones (sec. con núm. de ident.: 12) que codifica el fragmento putativo del dominio extracelular 1 (EC1) de CLDN6 (sec. con núm. de ident.: 7) como una fusión con un péptido señal derivado del líder N-terminal de Ig kappa seguido de 4 aminoácidos adicionales para asegurar que se preparó un sitio de escisión de peptidasa de señal correcta (sec. con núm. de ident.: 13) y se clonó en el vector pcDNA3.1 myc-His que rinde el vector p3973. Antes de la inmunización, la expresión del fragmento EC1 se confirmó mediante microscopía de inmunofluorescencia en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente y fijadas con paraformaldehído (PFA) por medio del uso de un anticuerpo anti-myc disponible en el mercado (Cell Signaling, MAB 2276).

b. Inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/c con 25 µg de ADN plasmídico p3973 junto con 4 µl de PEI-manosa (PEI-Man; in vivo-jetPEI™-Man de PolyPlus Transfection) (PEI-Man 150 mM en H₂O con glucosa al 5%) por inyección intraperitoneal los días 0 y 14. En los días 28 y 44 los ratones se inmunizaron por la vía subcutánea con los péptidos conjugados con KLH de la sec. con núm. de ident.: 14 y la sec. con núm. de ident.: 15 (100 µg de cada en PBS, JPT Peptide Technologies GmbH, Alemania) junto con PTO-CpG-ODN purificado por HPLC (25 µg en PBS; 5-TCCATGACGTTCCCTGACGTT; Eurofins MWG Operon, Alemania). En los días 64, 77 y 97 se inmunizaron ratones mediante la inyección intraperitoneal con 2 x 10⁷ células de mieloma P3X63Ag8U.1 transfectadas con el vector p3953 para expresar de forma estable la CLDN6. Antes de la administración, las células se trataron con mitomicina-C (2,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, M4287). En los días 64 y 97 las células se administraron junto con PTO-CpG-ODN purificado por HPLC (50 µg en PBS), el día 77 junto con adyuvante de Freund incompleto.

Para la generación de anticuerpos monoclonales, los ratones con respuestas inmunes anti-CLDN6 detectables se reforzaron cuatro días antes de la esplenectomía mediante inyección intraperitoneal de 2 x 10⁷ células de HEK293 establemente transfectadas con el vector p3953.

c. Pruebas de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Citometría de flujo

Para probar la unión de los anticuerpos monoclonales a CLDN6 y sus células homólogas HEK293T, se transfectaron transitoriamente con el plásmido que codifica la claudina correspondiente y la expresión se analizó por citometría de flujo. Para diferenciar entre las células transfectadas y no transfectadas, se cotransfectaron las células HEK293T con un marcador de fluorescencia como reportero. 24 h después de la transfección se recogieron las células con tripsina/EDTA al 0,05%, se lavaron con tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón FACS a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con el anticuerpo apropiado a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 4°C. Se usó un anticuerpo de reactividad cruzada para detectar la expresión de CLDN6 y CLDN9. Los anticuerpos anti-claudina de ratón disponibles en el mercado anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) y anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) sirvieron como controles positivos, mientras que la IgG2a (Sigma, M9144) e IgG2b (Sigma, M8894) de ratón, respectivamente, sirvieron como control de isotipo. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y se incubaron con un anticuerpo secundario específico de IgG 1+2a+2b+3a conjugado con APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. La unión se analizó mediante citometría de flujo por medio del uso de una matriz BD FACS. La expresión del marcador de fluorescencia se trazó en el eje horizontal contra la unión del anticuerpo en el eje vertical.

CDC

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se determinó midiendo el contenido de ATP intracelular en las células no lisadas después de la adición del complemento humano a las células objetivo incubadas con los anticuerpos anti-CLDN6. Como un método analítico muy sensible, la reacción luminiscente de la luciferasa se usó para medir el ATP.

Las células CHO-K1 establenmente transfectadas con CLDN6 (CHO-K1-CLDN6) se cosecharon con tripsina/EDTA al 0,05%, se lavaron dos veces con medio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) y se suspendieron en una concentración de 1×10^7 células/ml en medio X-Vivo 15. Se transfirieron 250 μ l de la suspensión celular a una cubeta de electroporación de 0,4 cm y se mezclaron in vitro con 7 μ g de ARN transcrito que codifica para la luciferasa (ARN de la luciferasa IVT). Las células se electroporaron a 200 V y 300 μ F por medio del uso de un Gene Pulser Xcell (Bio Rad). Después de la electroporación, las células se suspendieron en 2,4 ml de D-MEM/F12 precalentado (1:1) con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 31331-093) que contenía FCS al 10% (v/v), penicilina/estreptomina al 1% (v/v) y 1,5 mg/ml de G418. SE sembraron 50 μ l de la suspensión celular por pocillo en una placa de PP blanca de 96 pocillos y se incubaron a 37°C y CO₂ al 7,5%. 24 h después de la electroporación, 50 μ l de anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 en RPMI al 60% (que contenía HEPES 20 mM) y suero humano al 40% (grupo de suero obtenido de seis donantes sanos) se añadieron a las células en las concentraciones indicadas. Se añadieron 10 μ l de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS por pocillo a los controles de *lisis total*, mientras que se añadieron 10 μ l de PBS por pocillo a los controles con el *máximo de células viables* y a las muestras reales. Después de una incubación de 80 minutos a 37°C y CO₂ a 7,5%, se adicionaron por pocillo 50 μ l de la mezcla de luciferina (D-luciferina 3,84 mg/ml, ATPasa 0,64 U/ml y HEPES 160 mM en ddH₂O). La placa se incubó en la oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió por medio del uso de un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se dan como unidades de luz relativa digital integrada (RLU).

Las células NEC8 se sometieron a electroporación a 200 V y 400 μ F y se cultivaron en RPMI 1640 con medio GlutaMAX-I (Invitrogen, 61870) que contenía FCS al 10% (v/v).

La lisis específica se calcula como:

$$\text{Lisis específica [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{muestra-lisis total})}{(\text{máximo de células viables-lisis total})} \times 100 \right]$$

máximo de células viables: 10 μ l PBS, sin anticuerpo

lisis total: 10 μ l de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS, sin anticuerpo

Tratamiento temprano

Para los primeros tratamientos con anticuerpos 2×10^7 células de NEC8 en 200 μ l de PBS se inocularon por vía subcutánea en el costado de ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. Cada grupo experimental consistió en diez ratones hembras de 6 - 8 semanas de edad. Tres días después de la inoculación, se aplicaron 200 μ g de anticuerpos monoclonales murinos purificados muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A durante 46 días alternando inyecciones intravenosas e intraperitoneales dos veces a la semana. Los grupos experimentales tratados con PBS sirvieron como controles negativos. El volumen tumoral (TV = (longitud x ancho²)/2) se controló dos veces por semana. TV se expresa en mm³, lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral en el tiempo. Cuando el tumor alcanzó un volumen superior a 1500 mm³, se sacrificaron los ratones.

d. Resultados

Los anticuerpos monoclonales murinos muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron una fuerte unión al CLDN6 humano y a la variante I143V de CLDN6 SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), mientras que no se observó unión a CLDN3, 4 y 9 (Fig. 6).

MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A exhibieron valores muy bajos de EC50 (EC50 200-500 ng/ml) y la saturación de la unión se logró a bajas concentraciones (Fig. 7).

MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A exhibieron actividad de CDC dependiente de la dosis e indujeron CDC a bajas concentraciones (Fig. 8). Los anticuerpos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B indujeron CDC en las células NEC8 de una manera dependiente de la dosis (Fig. 9). Se demostró la especificidad objetivo de muMAB 65A y 66B por medio del uso de las células NEC8 LVTS2 54 (CLDN6 reducida).

Además, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones injertados con las células NEC8 (Fig. 10).

Ejemplo 7: Generación y prueba de anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLDN6

a. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/humano

Para la quimerización, la región variable de la cadena pesada y cadena ligera murina que incluye las secuencias líder se amplificaron mediante PCR por medio del uso de iniciadores enumerados en la tabla más abajo. Las cadenas pesadas

murinas se fusionaron mediante un sitio de restricción Apal (5'-GGGCC-3') a la parte N-terminal de la cadena Fc γ 1 humana, que se codificó por el vector de expresión. Los dominios variables de la cadena kappa murina que incluyen las secuencias líder se clonaron delante de la región constante por medio del uso de un sitio de restricción BsiWI. La orientación correcta de la región constante en el vector, es decir, adecuada para el promotor que antecede al vector, se verificó mediante secuenciación. Debido a la posición del sitio de restricción Apal, cualquier amplificación de una región variable que incluya la secuencia líder para este fin debe incluir los primeros 11 nucleótidos de la secuencia de la región constante gamma-1 humana, además, de la secuencia del sitio Apal. La secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana se enumera como la sec. con núm. de ident.: 24, la secuencia de aminoácidos de la región constante de gamma-1 humana así expresada se enumera como la sec. con núm. de ident.: 25. La secuencia de nucleótidos que codifica la parte constante de la cadena ligera kappa se enumera como la sec. con núm. de ident.: 26, la secuencia de aminoácidos respectiva se enumera como la sec. con núm. de ident.: 27.

Tabla 1: Líneas celulares de hibridoma de ratón usadas para la clonación de anticuerpos

| | muMAB | Isotipo | Sec. con núms. de ident. de iniciadores |
|---------------|-------|---------|---|
| cadena pesada | 64A | IgG2a | 17, 18 |
| | 89A | IgG2a | 17, 19 |
| | 61D | IgG2a | 17, 20 |
| | 67A | IgG2a | 17, 20 |
| cadena ligera | 64A | IgK | 21, 22 |
| | 89A | IgK | 21, 23 |
| | 61D | IgK | 21, 22 |
| | 67A | IgK | 21, 22 |

En correspondencia con sus contrapartes murinas, los anticuerpos monoclonales quiméricos se nombraron añadiendo el prefijo "chim", por ejemplo, chimAB 64A.

La amplificación de las regiones variables murinas de cadenas ligeras y pesadas que incluyen secuencias líder se llevó a cabo de acuerdo con el método de "PCR por etapas" descrito en Matz y otros (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, núm. 6). Para esto, se preparó ARN total a partir de las líneas celulares de hibridoma monoclonal (ver la Tabla 1) mediante los métodos estándar conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, con el uso del miniestuche RNeasy (Qiagen). Se preparó ADNc monocatenario de acuerdo con el método de "cambio de molde" descrito, además, en Matz y otros, (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, núm. 6, 1558). Además de un oligómero (dT)₃₀ (sec. con núm. de ident.: 28), se incluyó un oligómero híbrido de ADN/ARN (sec. con núm. de ident.: 29) que sirve como un adaptador 5' para el cambio de molde durante la polimerización de la cadena de ADNc. En este oligómero adaptador, los últimos tres nucleótidos fueron ribonucleótidos en lugar de desoxirribonucleótidos. La posterior "PCR por etapas" usó un oligómero antisentido dirigido a la región constante de la cadena kappa de ratón o a la región constante de la subclase 2a de la cadena gamma (sec. con núm. de ident.: 30 y 31, respectivamente). La subclase IgG del anticuerpo monoclonal murino producido por las líneas celulares de hibridoma se analizó antes inmunológicamente con IsoStrip (Roche), y en consecuencia, se seleccionó el oligómero antisentido apropiado (ver la Tabla 1). Una mezcla de iniciadores sirvió como oligómero sentido en la "PCR por etapas", que comprende los dos oligómeros enumerados en las sec. con núms. de ident.: 32 y 33.

Las regiones variables murinas identificadas que incluyen las secuencias líder se amplificaron después por PCR omitiendo el UTR 5' y la región constante 3' de ratón, añadiendo los sitios de restricción a los extremos que permitieron la subclonación en los vectores de expresión preparados que portan las regiones constantes humanas. Además, los oligómeros sentido proporcionaron una secuencia Kozak consenso (5'-GCCGCCACC-3') y los oligómeros antisentido para las regiones variables de la cadena pesada incluyeron los primeros 11 nucleótidos de la región constante gamma-1 humana además del sitio de restricción Apal (ver Tabla 1, sec. con núms. de ident.: 17- a 23). Se clonaron las regiones variables de la cadena ligera Kappa que incluyen las secuencias líder por medio del uso de las enzimas de restricción HindIII y BsiWI, las regiones variables de la cadena pesada gamma demandaron las enzimas de restricción HindIII y Apal.

Se amplificaron las regiones variables murinas adicionales de las cadenas ligeras y pesadas que incluyen las secuencias líder y se generaron los anticuerpos monoclonales quiméricos adicionales contra CLDN6 de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente.

65

b. Producción de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6

Los anticuerpos monoclonales quiméricos se expresaron transitoriamente en las células HEK293T (ATCC CRL-11268) transfectadas con el ADN plasmídico que codifica las cadenas ligera y pesada del anticuerpo correspondiente. 24 h antes de la transfección se sembraron 8×10^7 células en placas de cultivo celular de 145 mm y se cultivaron en 25 ml de medio HEK293T (DMEM/F12 + GlutaMAX-I, FCS al 10%, penicilina estreptomocina al 1%). Se disolvieron por placa de cultivo celular, 20 μ g de ADN plasmídico en 5 ml de medio HEK293T sin suplementos. Después de añadir 75 μ l de polietilenimina lineal (PEI) (1 mg/ml) (Polyscience, 23966) la mezcla (DNA:PEI) se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de transfección se añadió gota a gota a las células. 24 h después de la transfección, el medio HEK293T se reemplazó con el medio Pro293a (Lonza, BE12-764Q) que contenía penicilina/estreptomocina al 1%. Para la expresión óptima, las células transfectadas se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 7,5% durante 96 a 120 horas adicionales. Se recogió el sobrenadante y se purificó el anticuerpo quimérico mediante FPLC por medio del uso de las columnas de proteína A. Se determinó la concentración del anticuerpo y se analizó la calidad mediante SDS-PAGE.

c. Prueba de anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLDN6

Citometría de flujo

Para probar las especificidades y afinidades de los anticuerpos monoclonales quiméricos específicos a CLDN6 que se unen a las células HEK293 transfectadas de forma estable con CLDN3, 4, 6 o 9, respectivamente, y se analizaron por citometría de flujo las líneas de células tumorales que expresan endógenamente CLDN6. Por lo tanto, las células se recogieron con tripsina/EDTA al 0,05%, se lavaron con tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón FACS a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se incubaron 100 μ l de la suspensión celular con el anticuerpo apropiado a las concentraciones indicadas durante 60 minutos a 4 °C. Se usó un anticuerpo quimérico de reacción cruzada (chimAB 5F2D2) para detectar la expresión de CLDN6 y CLDN9. Los anticuerpos anti-claudina de ratón comercialmente disponibles anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) y anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) sirvieron como controles positivos, mientras que IgG1-kappa humano (Sigma, 15154) sirvió como control negativo. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y se incubaron durante 30 min a 4 °C con un anti-Fc-gamma IgG humano de cabra conjugado con APC (Dianova, 109-136-170) o un anticuerpo secundario específico anti-IgG 1+2a+2b+3a de ratón conjugado con APC (Dianova, 115-135-164), respectivamente. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. La unión se analizó mediante citometría de flujo por medio del uso de una matriz BD FACS.

CDC

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se determinó midiendo el contenido de ATP intracelular en las células no lisadas después de la adición del complemento humano a las células objetivo incubadas con los anticuerpos anti-CLDN6. Como un método analítico muy sensible, la reacción bioluminiscente de la luciferasa se usa para medir el ATP.

En este ensayo, se usaron las células de tipo natural NEC8 (CLDN6 positivas) y las células NEC8 de expresión CLDN6 reducida (células CLDN6 negativas) que se transdujeron de forma estable con el constructo de expresión de la luciferasa. Las células se recogieron con Tripsina/EDTA al 0,05% y se ajustaron a una concentración de 2×10^5 en RPMI con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) que contenía FCS al 10% (v/v). Se sembraron 1×10^4 células en una placa de PP blanca de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5%. Después de la incubación, se añadieron a las células 50 μ l de anticuerpos anti-CLDN6 quiméricos monoclonales en RPMI al 60% (que contenía HEPES 20 mM) y suero humano al 40% (grupo de suero obtenido de seis donantes sanos) a las concentraciones indicadas. Se añadieron 10 μ l de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS por pocillo a los controles de *lisis total*, mientras que se añadieron 10 μ l de PBS por pocillo a los controles con el *máximo de células viables* y a las muestras reales. Después de una incubación adicional de 80 minutos a 37 °C y CO₂ al 5%, se añadió por pocillo 50 μ l de la mezcla de luciferina (D-luciferina 3,84 mg/ml, ATPasa 0,64 U/ml y HEPES 160 mM en ddH₂O). La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos. La bioluminiscencia se midió por medio del uso de un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se dan como unidades de luz relativa digital integrada (RLU).

La lisis específica se calcula como:

$$\text{Lisis específica [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{muestra-lisis total})}{(\text{máximo de células viables-lisis total})} \times 100 \right]$$

máximo de células viables: 10 μ l PBS, sin anticuerpo

lisis total: 10 μ l de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS, sin anticuerpo

ADCC

La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) se determinó midiendo el contenido de ATP intracelular en las células no lisadas después de la adición de PBMC humanas a las células objetivo incubadas con los anticuerpos anti-CLDN6. Como un método analítico muy sensible, la reacción bioluminiscente de la luciferasa se usa para medir el ATP.

En este ensayo, se usaron las células NEC-8 silvestre (CLDN6 positivas) y las células NEC-8 de expresión CLDN6 reducida (CLDN6 negativas), que se transdujeron de forma estable con el constructo de expresión de la luciferasa. Las células se cosecharon con Tripsina/EDTA al 0,05% y se ajustaron a una concentración de 2×10^5 células/ml en RPMI con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) que contenía FCS al 10% (v/v) y Hepes 20 mM. Se sembraron 1×10^4 células en una placa de PP blanca de 96 pocillos y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5%. Se aislaron PBMC a partir de muestras de sangre de donantes humanos mediante centrifugación en gradiente de densidad por medio del uso de Ficoll Hypaque (GE Healthcare, 17144003). Se aisló la interfase que contiene PMBC y las células se lavaron dos veces con PBS/EDTA (2 mM). 1×10^8 PBMC se sembraron en 50 ml de medio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) que contenía suero humano inactivado por calor al 5% (Lonza, US14-402E) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5%.

4 h después de la siembra de las células objetivo (NEC-8) se añadieron 25 µl de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en PBS a las células en las concentraciones indicadas. Se recogieron PBMC no adherentes, que se separaron dentro de las 2 h de incubación de los monocitos adherentes, y se ajustaron a 8×10^6 células/ml en medio X-vivo 15. Se añadió 25 µl de esta suspensión celular a las células objetivo y los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5%.

Después de la incubación de 24 horas, se añadieron 10 µl de Triton X-100 al 8% a los controles de *lisis total*, mientras que 10 µl de PBS por pocillo se añadieron a los controles con el *máximo de células viables* y a las muestras reales. Se añadió por pocillo, 50 µl de mezcla de luciferina (D-luciferina 3,84 mg/ml, ATPasa 0,64 U/ml y HEPES 160 mM en ddH₂O). La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La bioluminiscencia se midió usando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se dan como unidades de luz relativa digital integrada (RLU).

La lisis específica se calcula como:

$$\text{Lisis específica [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{muestra-lisis total})}{(\text{máximo de células viables-lisis total})} \times 100 \right]$$

máximo de células viables: 10 µl PBS, sin anticuerpo

lisis total: 10 µl de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS, sin anticuerpo

d. Resultados

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron una fuerte unión a CLDN6 humana mientras que no se observó unión a CLDN3, 4 y 9 (Fig. 11).

Con respecto a la unión a CLDN6 humana establemente expresada en la superficie de las células HEK293, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A y 89A exhiben valores de EC₅₀ muy bajos (EC₅₀ 450-600 ng/ml) y la saturación de unión se logró a baja concentraciones. ChimAB 67A y 61D mostraron valores EC₅₀ bajos (EC₅₀ 1000 ng/ml) y medios (EC₅₀ 2300 ng/ml), respectivamente (Fig. 12).

Con respecto a la unión a CLDN6 expresada endógenamente en células NEC8, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A y 89A exhibieron valores de EC₅₀ muy bajos (EC₅₀ 600-650 ng/ml) y la saturación de unión se logró a bajas concentraciones, mientras que chimAB 61D y 67A mostraron valores EC₅₀ medios (EC₅₀ 1700 ng/ml) y altos (EC₅₀ 6100 ng/ml), respectivamente (Fig. 13).

Con respecto a la unión a CLDN6 expresada endógenamente en células OV90, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 64A y 89A exhibieron valores de EC₅₀ muy bajos (EC₅₀ 550-600 ng/ml) y la saturación de unión se logró a bajas concentraciones. ChimAB 61D y 67A mostraron valores medios de EC₅₀ (EC₅₀ 1500 ng/ml y EC₅₀ 2300 ng/ml, respectivamente) (Fig. 14).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A exhibieron actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis en células NEC-8 (Fig. 15).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A exhibieron actividad de ADCC dependiente de la dosis en las células NEC-8 e indujeron ADCC incluso a bajas concentraciones del anticuerpo (Fig. 16).

5 Estos resultados muestran claramente la especificidad de estos anticuerpos monoclonales quiméricos a CLDN6.

Ejemplo 8: Tratamiento por medio del uso de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Tratamiento temprano

10

Durante los primeros tratamientos con anticuerpos, 2×10^7 células NEC8 en 200 μ l de medio RPMI (Gibco) se inocularon por vía subcutánea en el costado de ratones atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. Cada grupo experimental consistió en diez ratones hembras de 6 - 8 semanas de edad. Tres días después de la inoculación de las células tumorales se aplicaron 200 μ g de anticuerpo monoclonal murino purificado muMAB 89A durante siete semanas alternando las inyecciones intravenosas e intraperitoneales dos veces a la semana. El grupo experimental tratado con PBS sirvió como control negativo. El volumen tumoral ($TV = (\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$) se controló dos veces por semana. TV se expresa en mm^3 , lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral en el tiempo. Cuando los tumores alcanzaron un volumen superior a 1500 mm^3 , se sacrificaron los ratones.

15

20

Tratamientos avanzados

Durante los tratamientos con los anticuerpos de tumores de xenoinjertos avanzados, se inocularon por vía subcutánea 2×10^7 células NEC8 en 200 μ l de medio RPMI (Gibco) en el costado de los ratones hembras de 6 - 8 semanas de edad atímicos desnudos-*Foxn1^{nu}*. El volumen tumoral ($TV = (\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$) se controló dos veces por semana. TV se expresa en mm^3 , lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral en el tiempo. 15 a 17 días después de la inoculación de células tumorales, los ratones se dividieron en grupos de tratamiento de ocho animales por cohorte con tamaños de tumor homogéneos superiores a 80 mm^3 . Se aplicaron 200 μ g de anticuerpos monoclonales murinos purificados muMAB 61D, 64A, 67A y 89A durante cinco semanas alternando inyecciones intravenosas e intraperitoneales dos veces a la semana. Los grupos experimentales tratados con PBS y un anticuerpo inespecífico sirvieron como controles negativos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor que 1500 mm^3 , se sacrificaron los ratones.

25

30

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, los ratones tratados con anticuerpos monoclonales murinos muMAB 61D, 64A y 67A no mostraron crecimiento tumoral incluso después de detener la inmunoterapia (Fig. 17).

35

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, muMAB 89A mostró inhibición del crecimiento tumoral y no se detectaron tumores en ratones tratados con muMAB89A al final del estudio (Fig. 18).

40

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, muMAB 64A mostró una inhibición del crecimiento tumoral (Fig. 19).

45

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, los ratones tratados con muMAB 64A mostraron una supervivencia prolongada (Fig. 20).

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, se logró la inhibición del crecimiento tumoral con los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A (Fig. 21).

50

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, los ratones tratados con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 61D o 67A mostraron una supervivencia prolongada (Fig. 22).

55

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado por medio del uso de ratones injertados con NEC8 silvestre y células NEC8 con una expresión reducida estable de CLDN6, muMAB 64A y 89A solo muestran un efecto terapéutico en ratones injertados con NEC8 silvestre pero no en ratones injertados con las células NEC8 con una expresión reducida estable de CLDN6 que demuestran in vivo la especificidad a CLDN6 del anticuerpo (Fig. 23).

60

Ejemplo 9: Mapeo de epítomos de alta resolución de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Los anticuerpos monoclonales específicos de CLDN6 solo muestran una unión muy débil (si la hay) a los péptidos lineales en los estudios de mapeo de epítomos por ELISA, lo que implica que sus epítomos son conformacionales. Para analizar la interacción entre los anticuerpos descritos en la presente descripción y CLDN6 en su conformación nativa, la mutagénesis sitio dirigida en el cultivo de células de mamífero se usó como una técnica de mapeo de epítomos. Se

65

realizó la mutagénesis de barrido de alanina de los aminoácidos 27-81 y 137-161 dentro del primer y segundo dominio extracelular, respectivamente. Después de la expresión transitoria en las células HEK293T, se evaluaron los mutantes de CLDN6 por su capacidad de unirse a los anticuerpos monoclonales específicos. La unión alterada de un anticuerpo monoclonal específico a un mutante de CLDN6 sugiere que el aminoácido mutado es un contacto importante y/o un residuo conformacional. La unión se analizó mediante citometría de flujo. Para discriminar entre las poblaciones de células transfectadas y no transfectadas, las células se cotransfectaron con un marcador de fluorescencia.

Los residuos de aminoácidos de CLDN6 que son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6 se han identificado sistemáticamente mediante el barrido con alanina. Se generaron mutaciones de alanina y glicina mediante mutagénesis sitio dirigida (GENEART AG, Alemania). Para ensayar la unión de anticuerpos monoclonales quiméricos a CLDN6 silvestre y sus mutantes, las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con el plásmido que codifica la claudina correspondiente y la expresión se analizó mediante citometría de flujo. Para diferenciar entre las células transfectadas y no transfectadas, se cotransfectaron las células HEK293T con un marcador de fluorescencia como reportero. 24 h después de la transfección, las células se recogieron con tripsina/EDTA al 0,05%, se lavaron con tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón FACS a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se incubaron 100 μ l de la suspensión celular con 10 μ g/ml de anticuerpo durante 45 minutos a 4 °C. El anti-CLDN6 de ratón disponible en el mercado (R&D, MAB3656) se usó como control para detectar la expresión en la superficie celular de mutantes de CLDN6. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y se incubaron con el anti-IgG Fc gamma humana de cabra conjugada con APC (Dianova, 109-136-170) o un anticuerpo secundario específico anti-IgG 1+2a+2b+3a de ratón conjugada con APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón FACS. La unión dentro de la población de células transfectadas se analizó mediante citometría de flujo por medio del uso de una matriz BD FACS. Por lo tanto, la expresión del marcador de fluorescencia se trazó en el eje horizontal frente a la unión del anticuerpo en el eje vertical. La intensidad de señal promedio de un anticuerpo monoclonal quimérico específico a CLDN6 unido al mutante de CLDN6 se expresó como el porcentaje de unión de tipo silvestre. Los aminoácidos que son esenciales para la unión no mostraron unión después que se mutaron, mientras que los aminoácidos que soportan la unión mostraron sólo una unión reducida en comparación con el tipo silvestre.

El mapeo de epítomos de alta resolución demostró que los aminoácidos F35, G37, S39 y posiblemente T33 del primer dominio extracelular de CLDN6 son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos a CLDN6 chimAB 61D, 64A, 67A y 89A. El residuo I40 es esencial para la unión de chimAB 89A y contribuye a la unión de chimAB 61D y 67A. Además, L151 del segundo dominio extracelular de CLDN6 es importante para la interacción con chimAB 67A (Fig. 24).

| | |
|---|---------------------------------|
| Referencia del archivo del solicitante o el agente 342-52 PCT | Núm. de solicitud internacional |
|---|---------------------------------|

INDICACIONES RELACIONADAS CON EL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla PCT 13bis)

A. Las indicaciones realizadas a continuación se refieren al microorganismo depositado u otro material biológico referido en la descripción en la página 7 línea 47

B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Otros depósitos se identifican en una hoja adicional

Nombre de la institución del depósito
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Dirección de la institución del depósito (incluye código postal y país)
Inhoffenstr. 7 B
38124 Braunschweig
DE

| | |
|--|-------------------------------|
| Fecha del depósito: 21 de junio de 2010 | Núm. de acceso DSM ACC3067 |
|--|-------------------------------|

C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no es aplicable) Esta información continua en una hoja adicional

- Mieloma de ratón (*Mus musculus*) P3X63Ag8.653 fusionado con esplenocitos de ratón (*Mus musculus*)
- Hibridoma secretor de anticuerpo contra CLDN6 humana

D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE REALIZAN LAS INDICACIONES (en caso de que las indicaciones no sean para todos los Estados designados)

E. PROVISIÓN DE INDICACIONES SEPARADAS (dejar en blanco si no es aplicable)

Las indicaciones mencionadas anteriormente se enviarán al Buró Internacional más tarde (especificar la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo "Número de Acceso del Depósito")

| | |
|--|---|
| <p>Para uso exclusivo de la Oficina de recepción</p> <p><input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió con la solicitud internacional</p> <hr/> <p>Oficial autorizado</p> | <p>Para uso exclusivo del Buró Internacional</p> <p><input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió por el Buró Internacional el:</p> <hr/> <p>Oficial autorizado</p> |
|--|---|

Formulario PCT/RO/134 (Julio de 1998, reimpresso Enero de 2004)

Hoja adicional para el material biológico

Identificación de depósitos adicionales:

5 1) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos son:

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
 Inhoffenstr. 7 B
 38124 Braunschweig
 10 DE

| Fecha de los depósitos | Números de Acceso | Las indicaciones que se hacen más abajo se refieren al microorganismo depositado en la descripción en la(s) página(s) siguiente(s) |
|------------------------|-------------------|--|
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3068 | página 7, línea 48 |
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3069 | página 7, línea 49 |
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3070 | página 7, línea 50 |
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3071 | página 7, línea 51 |
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3072 | página 7, línea 52 |
| 21 de junio de 2010 | DSM ACC3073 | página 7, línea 53 |
| 31 de agosto de 2010 | DSM ACC3089 | página 7, línea 54 |
| 31 de agosto de 2010 | DSM ACC3090 | página 7, línea 55 |

Indicaciones adicionales para todos los depósitos mencionados anteriormente:

- 15
- Mieloma de ratón (Mus musculus) P3X63Ag8.653 fusionado con esplenocitos de ratón (Mus musculus)
 - Hibridoma secretor de anticuerpo contra CLDN6 humana

2) Depositario:

20 Todos los depósitos mencionados anteriormente se realizaron por:

Ganymed Pharmaceuticals AG
 Freiligrathstraße 12
 25 55131 Mainz
 DE

Lista de Secuencias

| | | |
|----|--|------|
| 5 | <110> Ganymed Pharmaceuticals AG et al. | |
| | <120> Anticuerpos para el tratamiento de cáncer | |
| | <130> 342-52 PCT | |
| 10 | <150> EP 09 014 136.7 | |
| | <151> 2009-11-11 | |
| | <150> EP 10 006 956.6 | |
| 15 | <151> 2010-07-06 | |
| | <150> US 61/361,618 | |
| | <151> 2010-07-06 | |
| 20 | <150> US 61/260,202 | |
| | <151> 2009-11-11 | |
| | <160> 53 | |
| 25 | <170> PatentIn versión 3.5 | |
| | <210> 1 | |
| | <211> 1369 | |
| | <212> ADN | |
| 30 | <213> Homo sapiens | |
| | <400> 1 | |
| | cgacactcgg cctaggaatt tcccttatct ccttcgcagt gcagctcctt caacctcgcc | 60 |
| 35 | atggcctctg ccggaatgca gatcctggga gtcgtcctga cactgctggg ctgggtgaat | 120 |
| | ggcctggtct cctgtgcctt gcccatgtgg aaggtgaccg ctttcatcgg caacagcatc | 180 |
| 40 | gtggtggccc aggtggtgtg ggagggcctg tggatgtcct gcgtggtgca gagcaccggc | 240 |
| | cagatgcagt gcaaggtgta cgactcactg ctggcgctgc cacaggacct gcaggctgca | 300 |
| | cgtgccctct gtgtcatcgc cctccttctg gccctgttcg gcttctggtt ctaccttgct | 360 |
| 45 | ggggccaagt gtaccacctg tgtggaggag aaggattcca agggccgctt ggtgctcacc | 420 |
| | tctgggattg tctttgtcat ctccaggggtc ctgacgctaa tccccgtgtg ctggacggcg | 480 |
| | catgccatca tccgggactt ctataacccc ctggtggctg agggccaaaa gcgggagctg | 540 |
| 50 | ggggcctccc tctacttggg ctggggggcc tcaggccttt tgttctgctgg tggggggtt | 600 |
| | ctgtgctgca cttgcccttc gggggggtcc cagggcccca gccattacat ggcccgtac | 660 |
| | tcaacatctg ccctgccat ctctcggggg ccctctgagt accctaccaa gaattacgtc | 720 |
| 55 | tgacgtggag gggaatgggg gctccgctgg cgctagagcc atccagaagt ggcagtgcc | 780 |
| | aacagctttg ggatgggttc gtaccttttg tttctgcctc ctgctatttt tcttttgact | 840 |
| | gaggatattt aaaattcatt tgaaaactga gccaaaggtg tgactcagac tctcacttag | 900 |
| 60 | gctctgctgt ttctcaccct tggatgatgg agccaaagag gggatgcttt gagattctgg | 960 |
| | atcttgacat gcccatctta gaagccagtc aagctatgga actaatgcgg aggctgcttg | 1020 |

65

ES 2 649 389 T3

ctgtgctggc tttgcaacaa gacagactgt cccaagagt tcctgctgct gctgggggct 1080
 gggcttcctt agatgtcact ggacagctgc ccccatcct actcaggtct ctggagctcc 1140
 5 tctcttcacc cctggaaaaa caaatgatct gtaacaaaag gactgcccac ctccggaact 1200
 tctgacctct gtttctctcg tcttgataag acgtccaccc cccagggcca ggtcccagct 1260
 atgtagacc cgcgccccac ctccaacact gcacccttct gcctgcccc cctcgtctca 1320
 10 cccctttac actcacattt ttatcaaata aagcatgttt tgttagtgc 1369

15 <210> 2
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 2

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

60

ES 2 649 389 T3

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

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

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

<210> 3
 <211> 805
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>>
 <223> secuencia de ácido nucleico optimizada por codones que codifica claudina 6 humana

20 <400> 3

| | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|-----|
| caagcgcgtc | aattaaccct | cactaaaggg | aacaaaagct | gttaattaac | taaggtacca | 60 |
| agcttgccac | catggccagc | gccggcatgc | agatcctggg | agtggtgctg | accctgctgg | 120 |
| gctgggtgaa | cggcctgggtg | tcttgccgcc | tgcccatgtg | gaaagtgacc | gccttcacgc | 180 |
| gcaacagcat | cgtggtggcc | caggtcgtgt | gggagggcct | gtggatgagc | tgtgtggtgc | 240 |
| agagcaccgg | ccagatgcag | tgcaaggtgt | acgacagcct | gctggccttg | cctcaggatc | 300 |
| tgcaggccgc | cagagccctg | tgtgtgatcg | ccctgctggt | cgccctgttc | ggcctgctgg | 360 |
| tgtacctcgc | tggcgccaag | tgaccacct | gtgtggagga | aaaggacagc | aaggcccggc | 420 |
| tggtcctgac | aagcggcatc | gtgttcgtga | tcagcggcgt | gctgacactg | atccccgtgt | 480 |
| gctggaccgc | ccacgccatc | atccgggact | tctacaacc | tctggtggcc | gaggcccaga | 540 |
| agagagagct | ggcgccagc | ctgtatctgg | gatgggcccgc | ctcaggactg | ctgctgctgg | 600 |
| gcggaggcct | gctgtgctgt | acatgtccta | gcggcggtc | ccagggcct | agccactaca | 660 |
| tggcccggta | cagcaccagc | gccctgcca | tcagcagagg | cccagcggag | tacccacca | 720 |
| agaactacgt | gtgataggaa | ttcgagctct | tatggcgcgc | ccaattcgcc | ctatagtgag | 780 |
| tcgtattacg | tcgcgctcac | tggcc | | | | 805 |

50 <210>> 4
 <211> 165
 <212>> ADN
 <213> Artificial

55 <220>>
 <223> secuencia de ácido nucleico optimizada por codones que codifica el bucle 2 extracelular (EC2) previsto de claudina 6 humana

<400> 4

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ggcgcgccaa | ggtaccaagc | ttgccaccat | ggaaaccgac | accctgctgc | tgtgggtgct | 60 |
| gctcctgtgg | gtcccaggct | ctacaggcga | cgccgcccag | cccagagact | tctacaacc | 120 |
| cctggtggcc | gaggcccaga | agctcgagtc | tagagggtta | attaa | | 165 |

65

ES 2 649 389 T3

<210> 5
 <211> 38
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 2do bucle extracelular previsto de claudina 6 humana que contiene una secuencia líder de Ig kappa
 10
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222>> (1)..(21)
 <223> secuencia líder de Ig kappa
 15
 <220>
 <221> DOMINIO
 <222>> (26)..(38)
 <223> 2do bucle extracelular (EC2) previsto de claudina 6 humana
 20
 <400> 5

 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 25 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu
 20 25 30
 30 Val Ala Glu Ala Gln Lys
 35

 <210> 6
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 Arg Asp Phe Tyr Asn Pro Leu Val Ala Glu Ala Gln Lys
 1 5 10
 40
 <210> 7
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 7

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

 Asp Leu Gln Ala Ala
 50
 60

 <210> 8
 <211> 220

ES 2 649 389 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
<222> (143)..(143)
<223> polimorfismo de claudina 6 I143V humana

10 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 <210> 9
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65 <400> 9

ES 2 649 389 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Gly Leu Leu Cys Cys Thr Cys Pro Pro Pro Gln Val Glu Arg
180 185 190

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

50 Ser Gly Leu Asp Lys Arg Asp Tyr Val
210 215

<210> 10
55 <211> 209
<212> PRT
<213> Homo sapiens
60 <400> 10

ES 2 649 389 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 Val

50 <210> 11
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 11

60

65

ES 2 649 389 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 12
 <211> 159
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> secuencia de ácido nucleico optimizada por codones que codifica el bucle 1 extracelular (EC1) previsto de claudina 6 humana
 <400> 12

60 cccatgtgga aagtgaccgc cttcatcggc aacagcatcg tgggtggcca ggtggtctgg 60
 gagggcctgt ggatgagctg cgtggtgcag agcaccggcc agatgcagtg caaggtgtac 120
 65 gacagcctgc tggccctgcc tcaggatctg caggctgct 159

ES 2 649 389 T3

<210> 13
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> 1er bucle extracelular previsto de claudina 6 humana que contiene una secuencia líder de Ig kappa
 10
 <220>
 <221> Señal
 <222> (1)..(21)
 <223> secuencia líder de Ig kappa
 15
 <220>
 <221> Dominio
 <222> (26)..(78)
 <223> 1er bucle extracelular (EC1) previsto de claudina 6 humana
 20
 <400> 13
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 25
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Pro Met Trp Lys Val Thr Ala
 20 25 30
 Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala Gln Val Val Trp Glu Gly Leu
 35 40 45
 30
 Trp Met Ser Cys Val Val Gln Ser Thr Gly Gln Met Gln Cys Lys Val
 50 55 60
 35
 Tyr Asp Ser Leu Leu Ala Leu Pro Gln Asp Leu Gln Ala Ala Leu Glu
 65 70 75 80
 40
 Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 85 90 95
 Met His Thr Gly His His His His His His
 100 105
 45
 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 14
 Pro Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile
 1 5 10
 55
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 15
 Met Trp Lys Val Thr Ala Phe Ile Gly Asn Ser Ile Val Val Ala
 1 5 10 15
 65

| | | |
|----|---|----|
| | <210> 16 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 5 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 16 | |
| 10 | tccatgacgt tctgacgtt | 20 |
| | <210> 17 | |
| | <211> 43 | |
| | <212> ADN | |
| 15 | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 17 | |
| 20 | gagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctggatcttt ctc | 43 |
| | <210> 18 | |
| | <211> 43 | |
| 25 | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido | |
| 30 | <400> 18 | |
| | gagagggccc ttggtggagg ctgaagagac tgtgagagtg gtc | 43 |
| | <210> 19 | |
| 35 | <211> 43 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| | <220> | |
| 40 | <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 19 | |
| | gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtc | 43 |
| 45 | <210> 20 | |
| | <211> 43 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 20 | |
| 55 | gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg | 43 |
| | <210> 21 | |
| | <211> 46 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 60 | <220> | |
| | <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 21 | |
| 65 | gagaaagctt gccgccacca tgcatttca agtgcagatt ttcagc | 46 |

ES 2 649 389 T3

<210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 22
 10 cacacgtacg ttgattcc agcttggtgc ctc 33
 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 20 <400> 23
 cacacgtacg ttgattcc agcttggtgc 33
 <210> 24
 <211> 993
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 30 gcctccacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccc gcagcaagag caccagcggc 60
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 120
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgcccgtgct gcagagcagc 180
 35 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 300
 aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgcccag ccccagagct gctgggcgga 360
 40 cccagcgtgt tcctgttccc ccccagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 420
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 540
 45 agcacctaca ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 600
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc 660
 aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccccccag ccgggaggag 720
 50 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa eggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 840
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 900
 55 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 960
 cagaagtccc tgagcctgag ccccggcaag tag 993
 60 <210> 25
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 25

ES 2 649 389 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 649 389 T3

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

5 <210> 26
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 26

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cgtacggtgg | ccgctcccag | cgtgttcac | ttcccccca | gcgacgagca | gctgaagtcc | 60 |
| ggcaccgcca | gcgtggtgtg | cctgctgaac | aacttctacc | cccgggaggg | caaggtgcag | 120 |
| tggaaggtgg | acaacgcct | gcagagcggc | aacagccagg | agagcgtcac | cgagcaggac | 180 |
| agcaaggact | ccacctacag | cctgagcagc | accctgacct | tgagcaaggc | cgactacgag | 240 |
| aagcacaagg | tgtacgcctg | cgaggtgacc | caccagggcc | tgtccagccc | cgtgaccaag | 300 |
| agcttcaaca | ggggcgagtg | ctag | | | | 324 |

25 <210> 27
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 27

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

55 <210> 28
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido

<220>
 <221> misc_feature

65 <222> (31)..(32)

| | | |
|----|--|----|
| | <223> cualquier nucleótido | |
| 5 | <400> 28 tttttttt tttttttt tttttttt nn | 32 |
| | <210> 29 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 10 | <220> <223> Oligonucleótido | |
| 15 | <400> 29 aagcagtggg atcaacgcag agtacgcggg | 30 |
| | <210> 30 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 20 | <220> <223> Oligonucleótido | |
| 25 | <400> 30 ctgctactg gatggtggga agatgg | 26 |
| 30 | <210> 31 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 35 | <220> <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 31 acagggcca gtggatagac cgatg | 25 |
| 40 | <210> 32 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> Oligonucleótido | |
| | <400> 32 gtaatcgac tctactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt | 45 |
| 50 | <210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial | |
| 55 | <220> <223> Oligonucleótido | |
| 60 | <400> 33 gtaatcgac tctactatagg gc | 22 |
| 65 | <210> 34 <211> 117 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | |

ES 2 649 389 T3

<220>

<223> Secuencia VH de anticuerpo

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

40 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35

<211> 107

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia VL de anticuerpo

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 649 389 T3

<210> 36
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia VH de anticuerpo
 <400> 36
 10
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 15
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 20
 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 25
 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 30
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 40
 Ala Arg Asp Tyr Gly Phe Val Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 45
 Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia VL de anticuerpo
 <400> 37
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Met Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 55
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 60
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Cys Ile Tyr
 35 40 45
 65
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Arg
 50 55 60
 70
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 75
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Tyr Pro Pro Trp
 85 90 95
 80
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 649 389 T3

<210> 38
 <211> 117
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia VH de anticuerpo

 10 <400> 38

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

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

 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 20 35 40 45

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

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

 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
 30 85 90 95

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

 35 Leu Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 39
 <211> 107
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia VL de anticuerpo

 45 <400> 39

 50

ES 2 649 389 T3

1 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 5 5 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 10 20 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 15 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 20 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu
 65 70 75 80
 25 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 25 <210> 40
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia VH de anticuerpo
 35 <400> 40
 1 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 5 10 15
 40 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 45 Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 50 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55 Ala Arg Asp Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 60 Leu Thr Val Ser Ser
 115
 65 <210> 41
 <211> 107

ES 2 649 389 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Secuencia VL de anticuerpo

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Secuencia CDR3 de VH de anticuerpo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 50 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, con mayor preferencia Phe o Tyr, con preferencia superlativa Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Leu o Phe, con mayor preferencia Leu

<400> 42

60 Xaa Gly Xaa Val Xaa
 1 5

<210> 48
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia CDR2 de VH de anticuerpo
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Thr, Ser o Ile, con preferencia superlativa Thr
 <400> 48
 15 Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa
 1 5
 <210> 49
 20 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia CDR3 de VL de anticuerpo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 30 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, con preferencia superlativa Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 35 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, con mayor preferencia Tyr, Ser, o Asn, con preferencia superlativa Asn
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 40 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Tyr, con mayor preferencia Tyr
 <400> 49
 45 Arg Xaa Xaa Xaa Pro
 1 5
 <210> 50
 50 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia CDR3 de VL de anticuerpo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 60 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, con preferencia superlativa Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)

ES 2 649 389 T3

<223> Cualquier aminoácido, preferentemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, con mayor preferencia Tyr, Ser, o Asn, con preferencia superlativa Asn

<220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Tyr, con mayor preferencia Tyr

<400> 50
 10 Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro
 1 5

<210> 51
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Secuencia CDR3 de VL de anticuerpo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 25 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, con preferencia superlativa Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 30 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, con mayor preferencia Tyr, Ser, o Asn, con preferencia superlativa Asn

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 35 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Tyr, con mayor preferencia Tyr

<400> 51
 40 Gln Gln Arg Xaa Xaa Xaa Pro Pro Trp Thr
 1 5 10

<210> 52
 45 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia CDR1 de VL de anticuerpo
 50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, con preferencia superlativa Ser
 55

<400> 52
 60 Ser Ser Val Xaa Tyr
 1 5

65

<210> 53
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Secuencia CDR2 de VL de anticuerpo

<400> 53

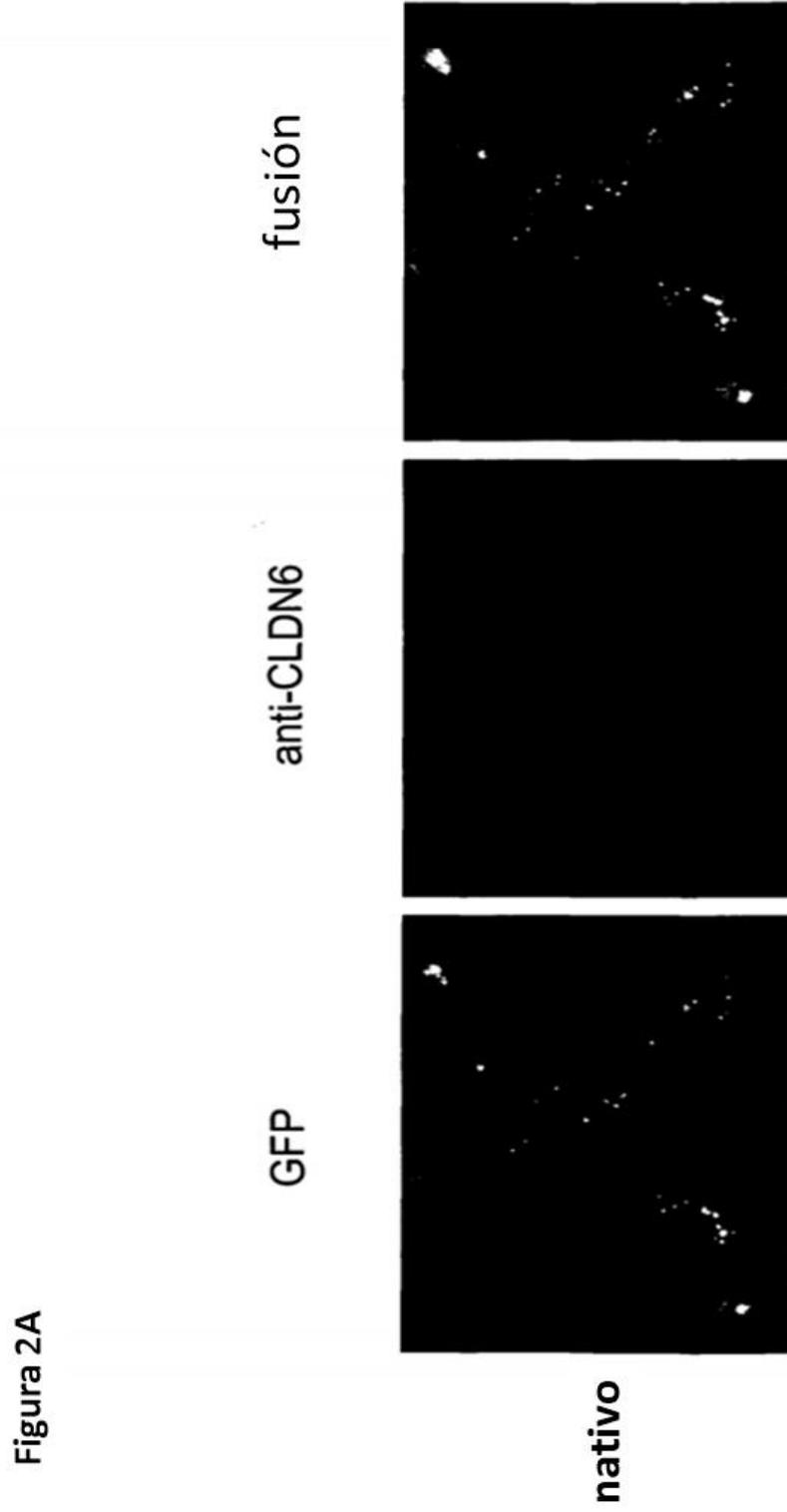
10

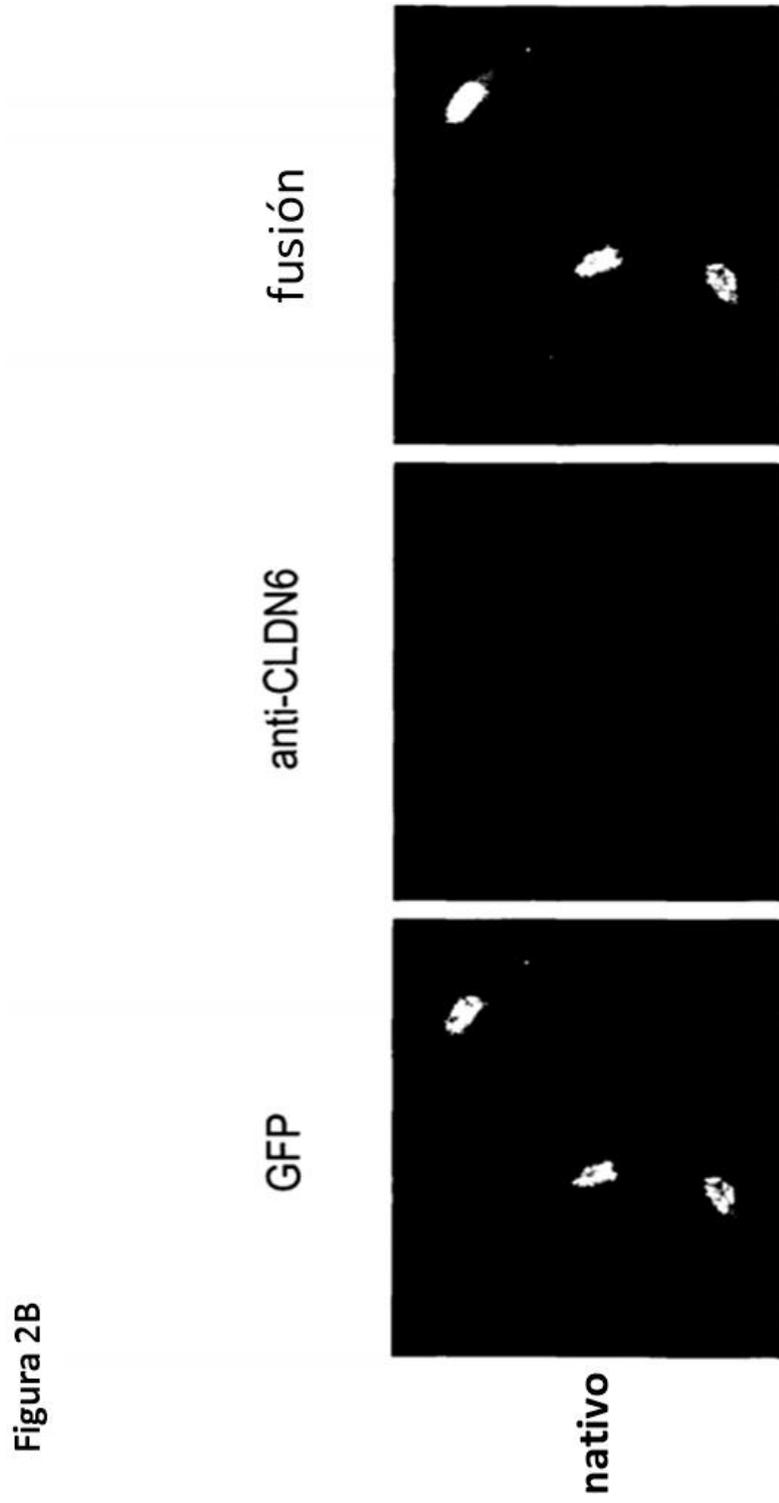
Ser Thr Ser
1

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo que es capaz de unirse a CLDN6, preferentemente, a CLDN6 asociada con la superficie de una célula que expresa la CLDN6, y es capaz de discriminar entre la CLDN6 en la superficie de una célula que expresa CLDN6 y un mutante de CLDN6 en la superficie de una célula que expresa dicho mutante de CLDN6, en donde dicho mutante de CLDN6 comprende una mutación de alanina en la posición 35, 37 o 39 de la sec. con núm. de ident.: 2 o de la sec. con núm. de ident.: 8, y en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo que comprende una secuencia de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en ARDYGVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, ARDYGFLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, ARDFGYVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38 y ARDYGVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40.
- 10
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que no es esencialmente capaz de unirse a CLDN9 asociada con la superficie de una célula que expresa CLDN9.
- 20 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que no es esencialmente capaz de unirse a CLDN4 asociada con la superficie de una célula que expresa CLDN4 y/o no es esencialmente capaz de unirse a CLDN3 asociada con la superficie de una célula que expresa CLDN3.
- 25 4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es específico para CLDN6.
5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es capaz de unirse a un epítipo localizado dentro de una porción extracelular de CLDN6, en donde dicha porción extracelular de CLDN6 comprende preferentemente la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6 o la sec. con núm. de ident.: 7.
- 30 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde CLDN6 tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2 o la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8.
- 35 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que tiene una o más de las siguientes actividades:
 (i) destruir una célula que expresa CLDN6,
 (ii) inhibir la proliferación de una célula que expresa CLDN6,
 (iii) inhibir la formación de colonias de una célula que expresa CLDN6,
 (iv) mediar la remisión de tumores establecidos,
 (v) prevenir la formación o la reformación de tumores, y
 (vi) inhibir la metástasis de una célula que expresa CLDN6,
 y/o que exhibe una o más funciones efectoras inmunes contra una célula que porta CLDN6 en su conformación nativa, en donde la una o más funciones efectoras inmunes se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación, preferentemente las funciones efectoras son ADCC y/o CDC.
- 40
- 45 8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.
- 50 9. Un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en (i) un anticuerpo producido o que puede obtenerse a partir de un clon depositado bajo el núm. de acceso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A), o DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A), (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo en (i) e (iii) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo en (i) caracterizado por comprender un conjunto de HCDR y LCDR seleccionados del grupo que consistente en
 (a) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGVLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 34, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 35;
 (b) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGFLVDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 36, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSNYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 37;
- 55
- 60
- 65

- (c) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGI identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDFGYVLDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 38, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVSY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRSTYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 39; y (d) un HCDR1 de secuencia de aminoácidos GYSFTGYT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un HCDR2 de secuencia de aminoácidos INPYNGGS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un HCDR3 de secuencia de aminoácidos ARDYGYVFDY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 40, un LCDR1 de secuencia de aminoácidos SSVNY identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41, un LCDR2 de secuencia de aminoácidos STS identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41, y un LCDR3 de secuencia de aminoácidos QQRNNYPPWT identificado dentro de la sec. con núm. de ident.: 41.
10. Un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
11. Un hibridoma depositado bajo el núm. de acceso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A), o DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A).
12. Un conjugado que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 acoplado a un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico preferentemente es una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y/o el conjugado de la reivindicación 12, y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y/o un conjugado de la reivindicación 12 para su uso en un método para inhibir el crecimiento, destruir o inhibir la expansión metastásica de una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 en su superficie celular, que comprende poner en contacto la célula con el anticuerpo y/o el conjugado.
15. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, un conjugado de la reivindicación 12 o una composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que involucra una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con su superficie celular en un sujeto.
16. El anticuerpo, conjugado o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores tal como cáncer, en donde el cáncer se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular, adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma ovárico, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, en particular, seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer de útero, un tumor de células germinales tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinales del testículo, y sus formas metastásicas.





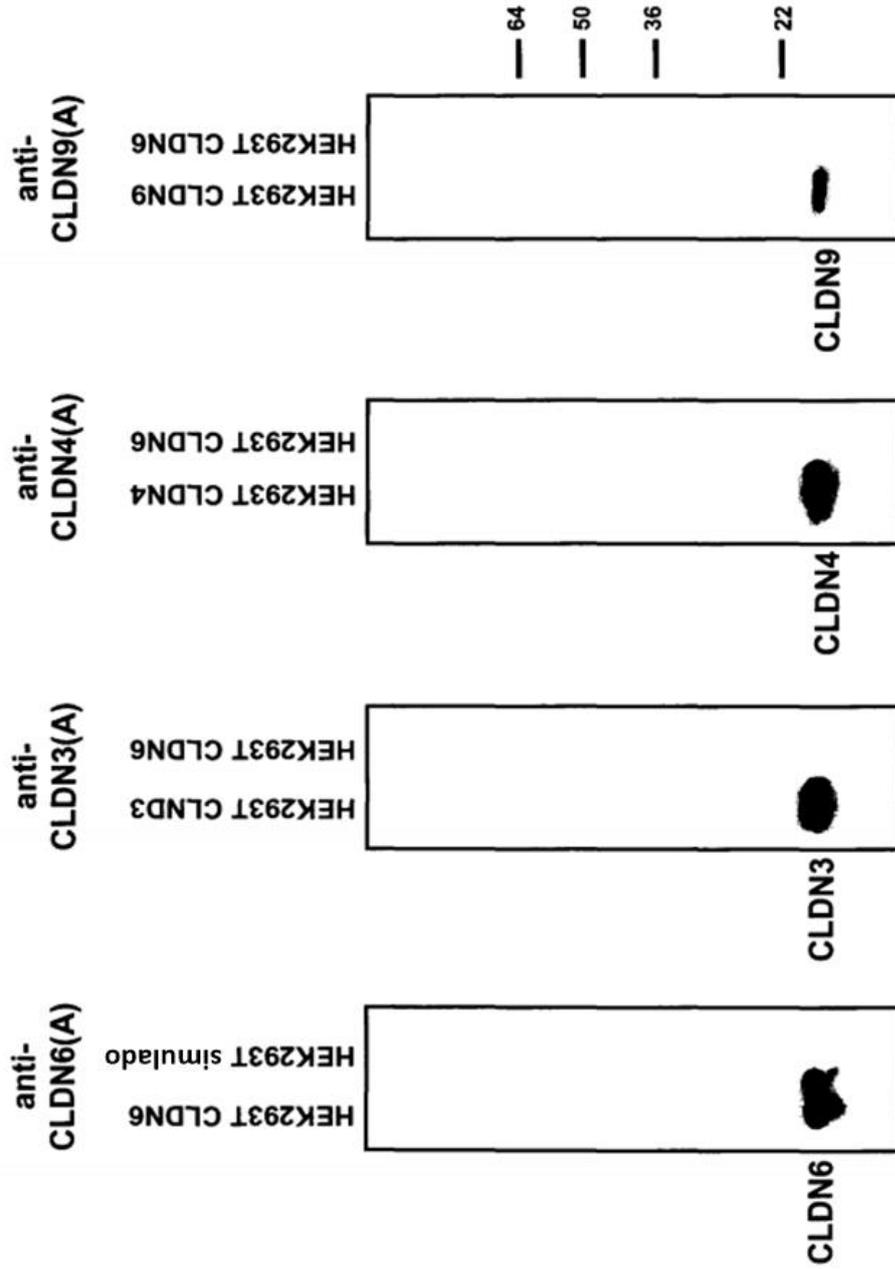


Figura 3

Figura 4

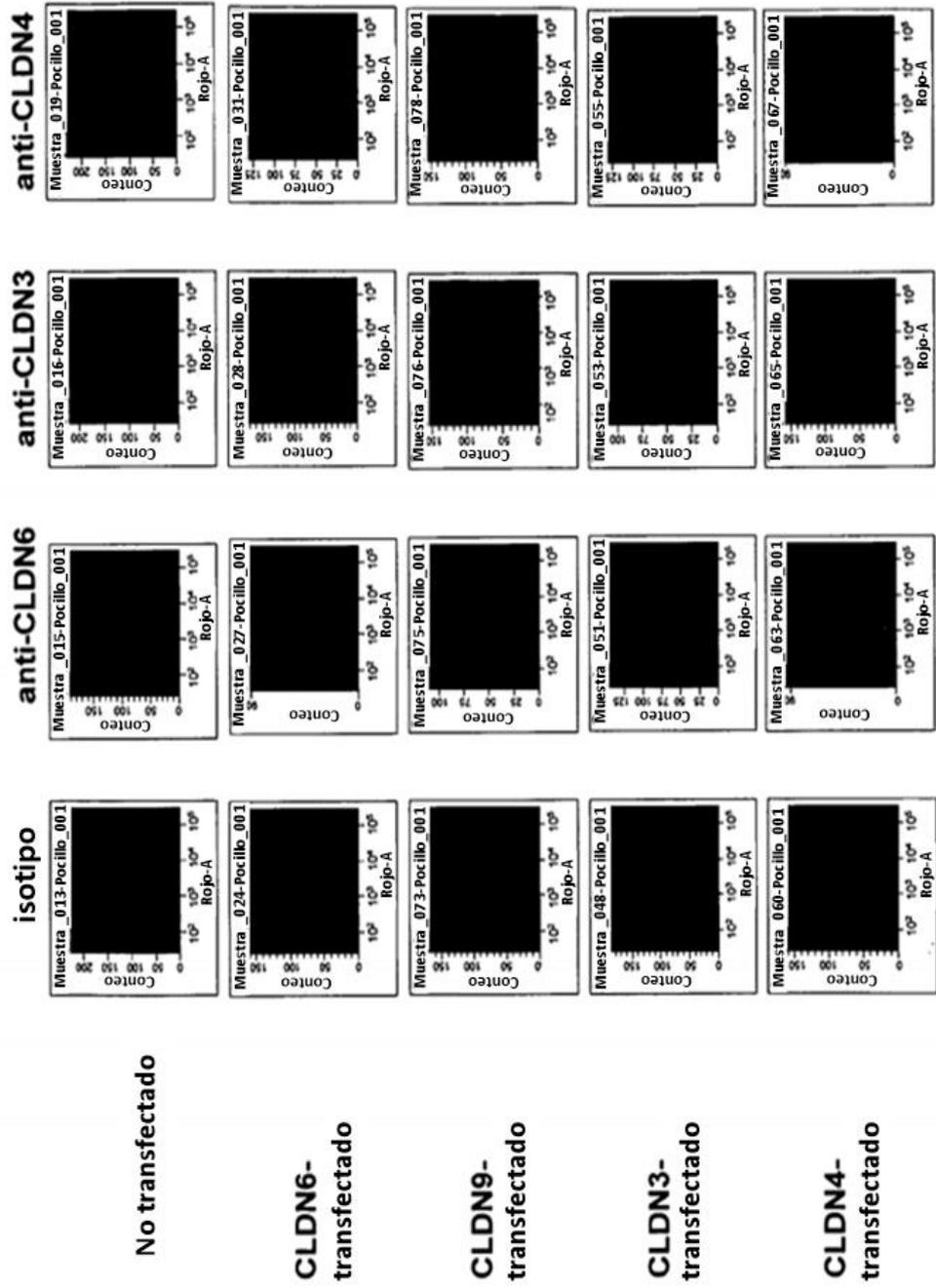
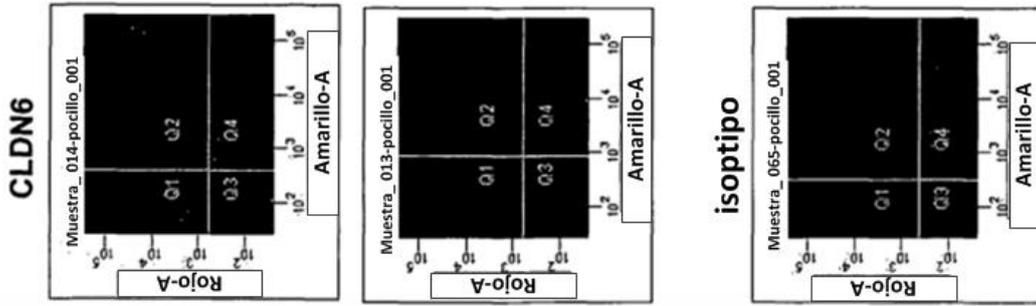
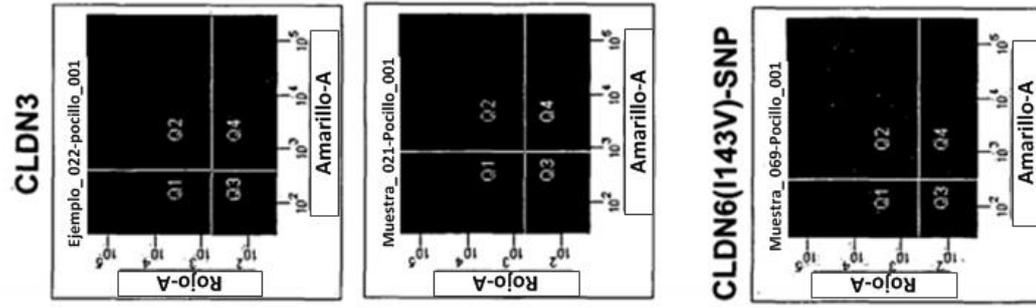


Figura 5A

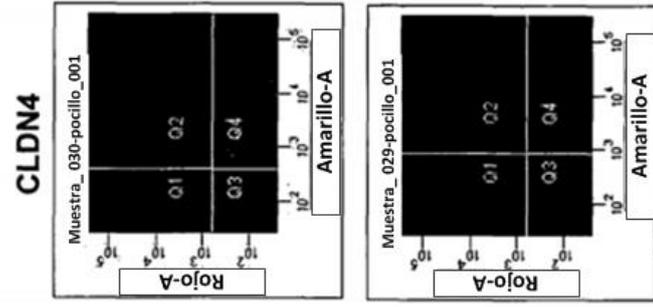
F3-6C3-H8



F4-4F7-F2



F3-6C3-H8



F3-6C3-H8

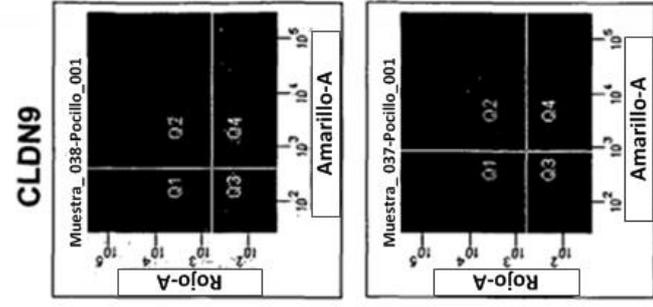
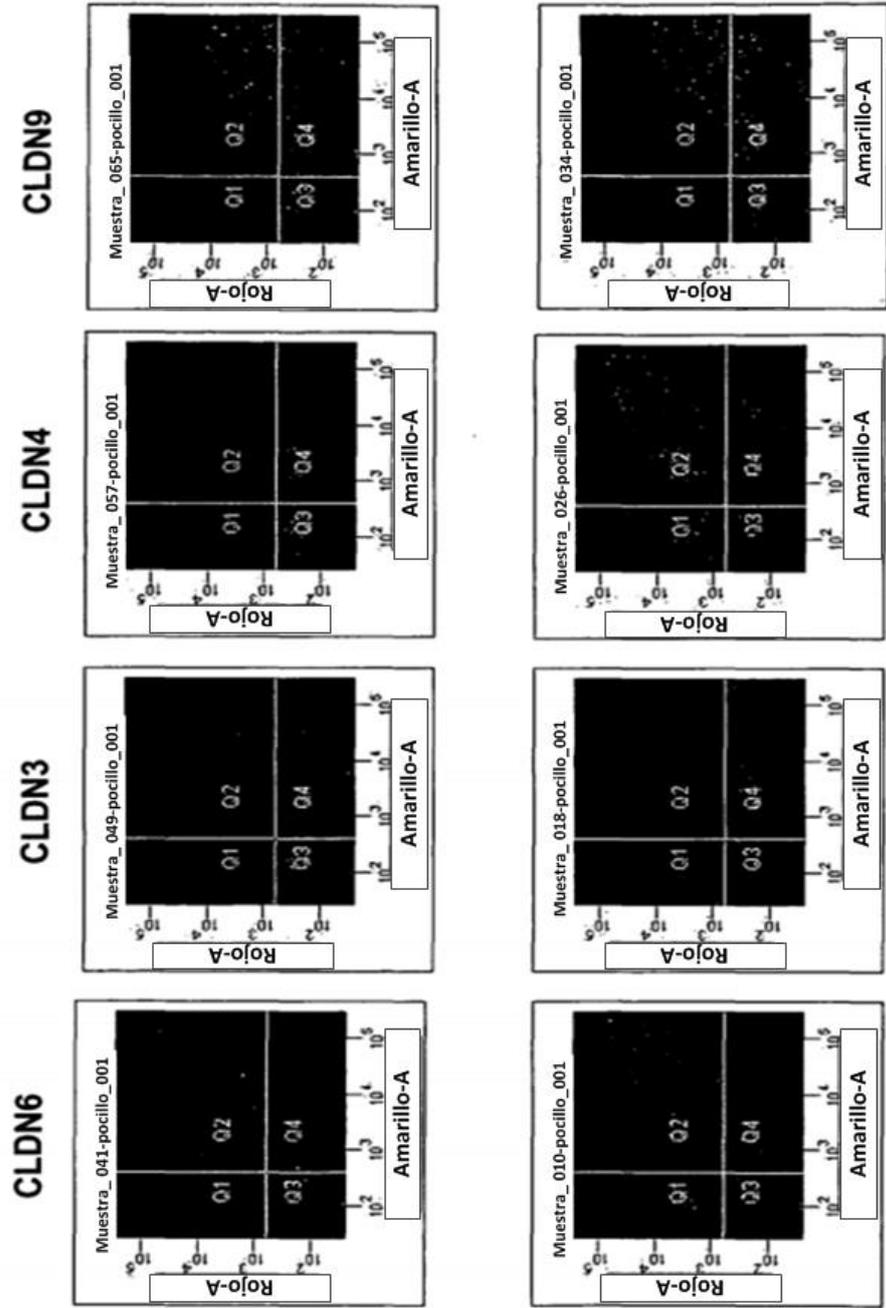


Figura 5B



F3-7B3-B4

F3-3F7-A5

Figura 6

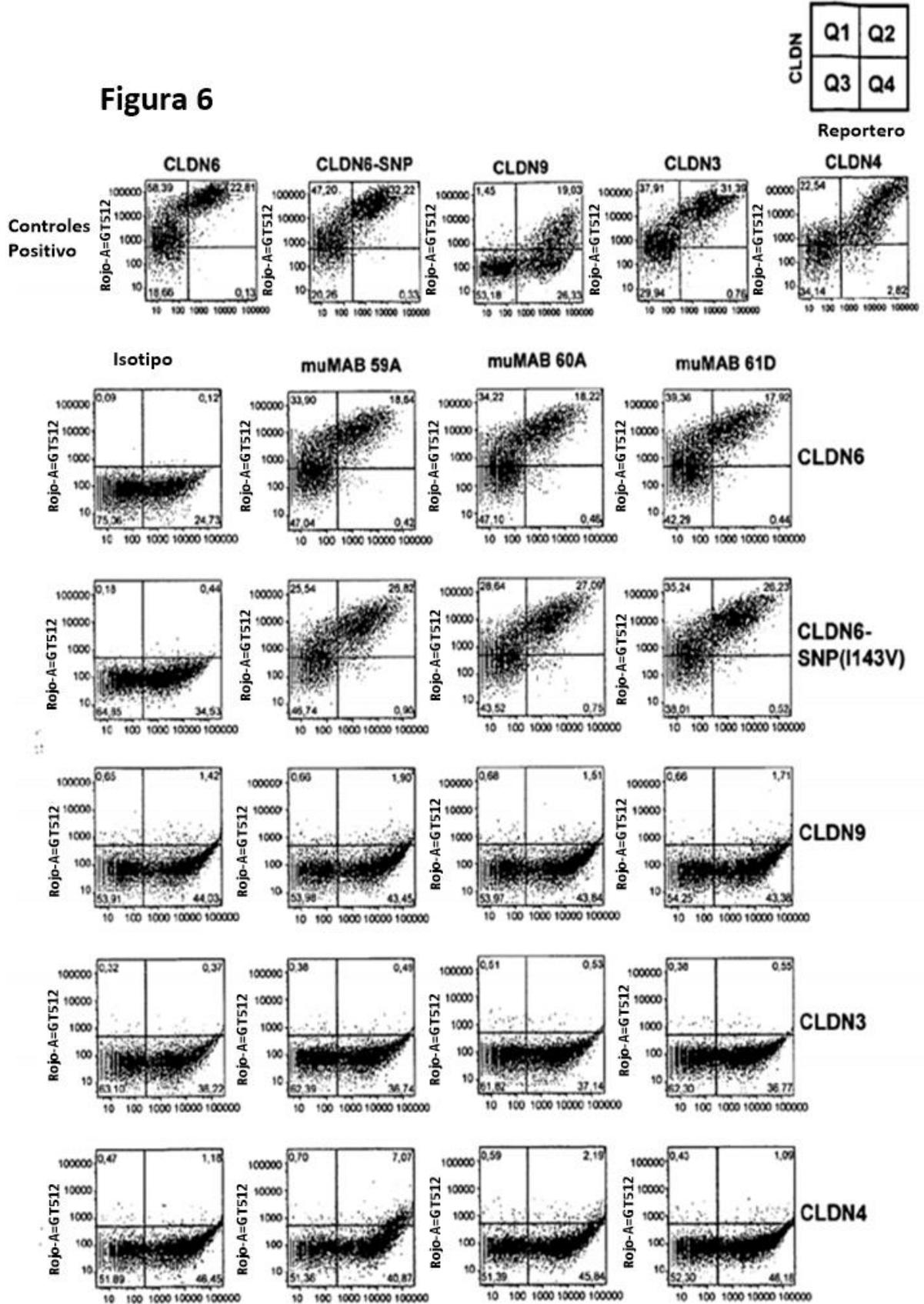
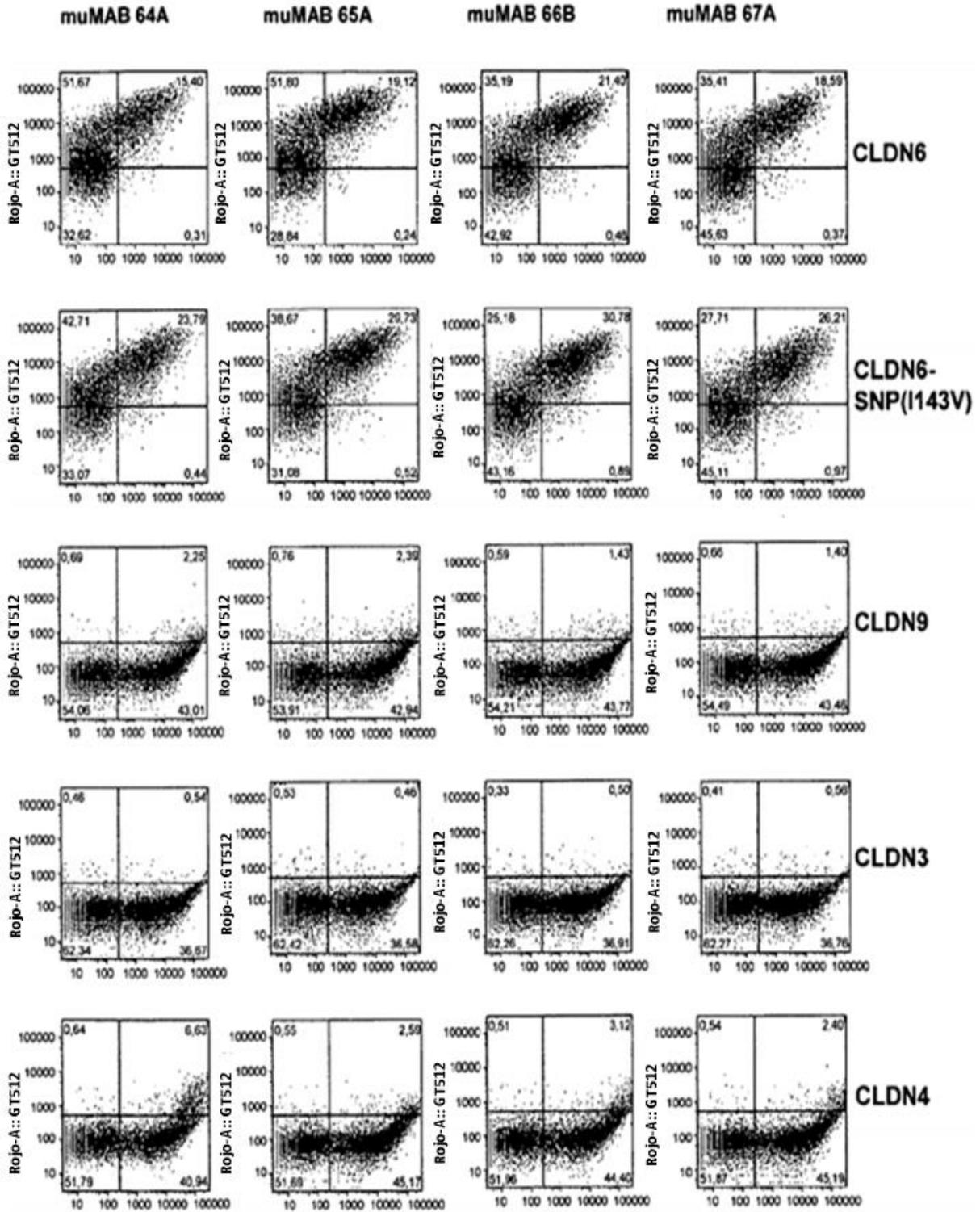


Figura 6 (cont.)



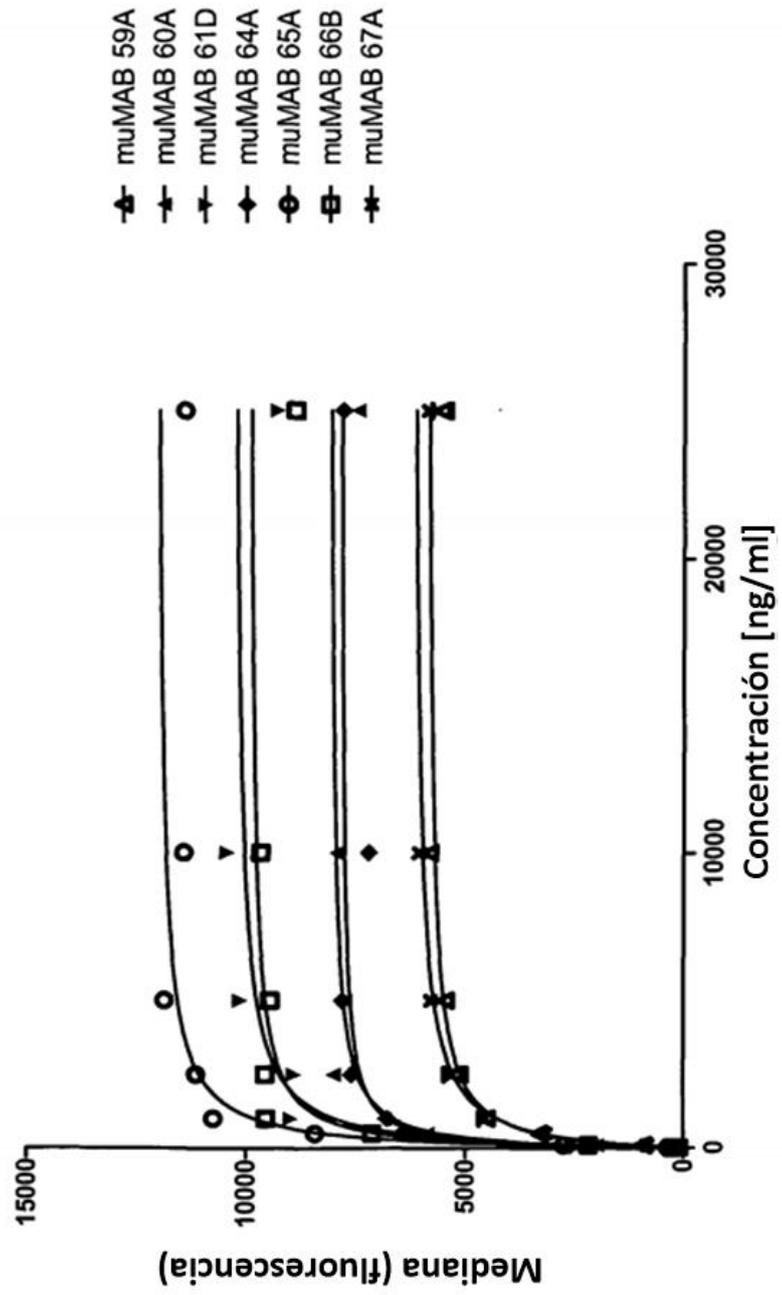
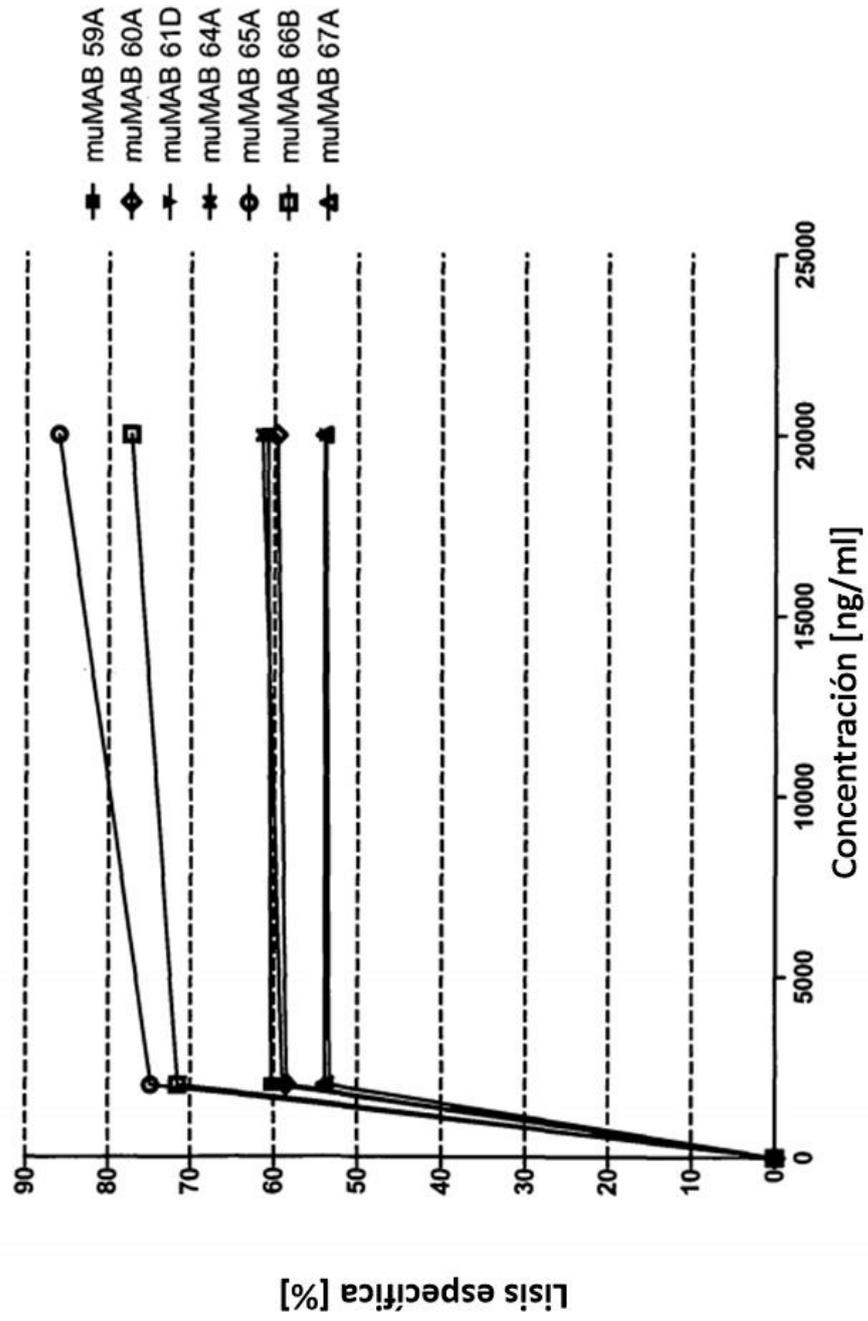
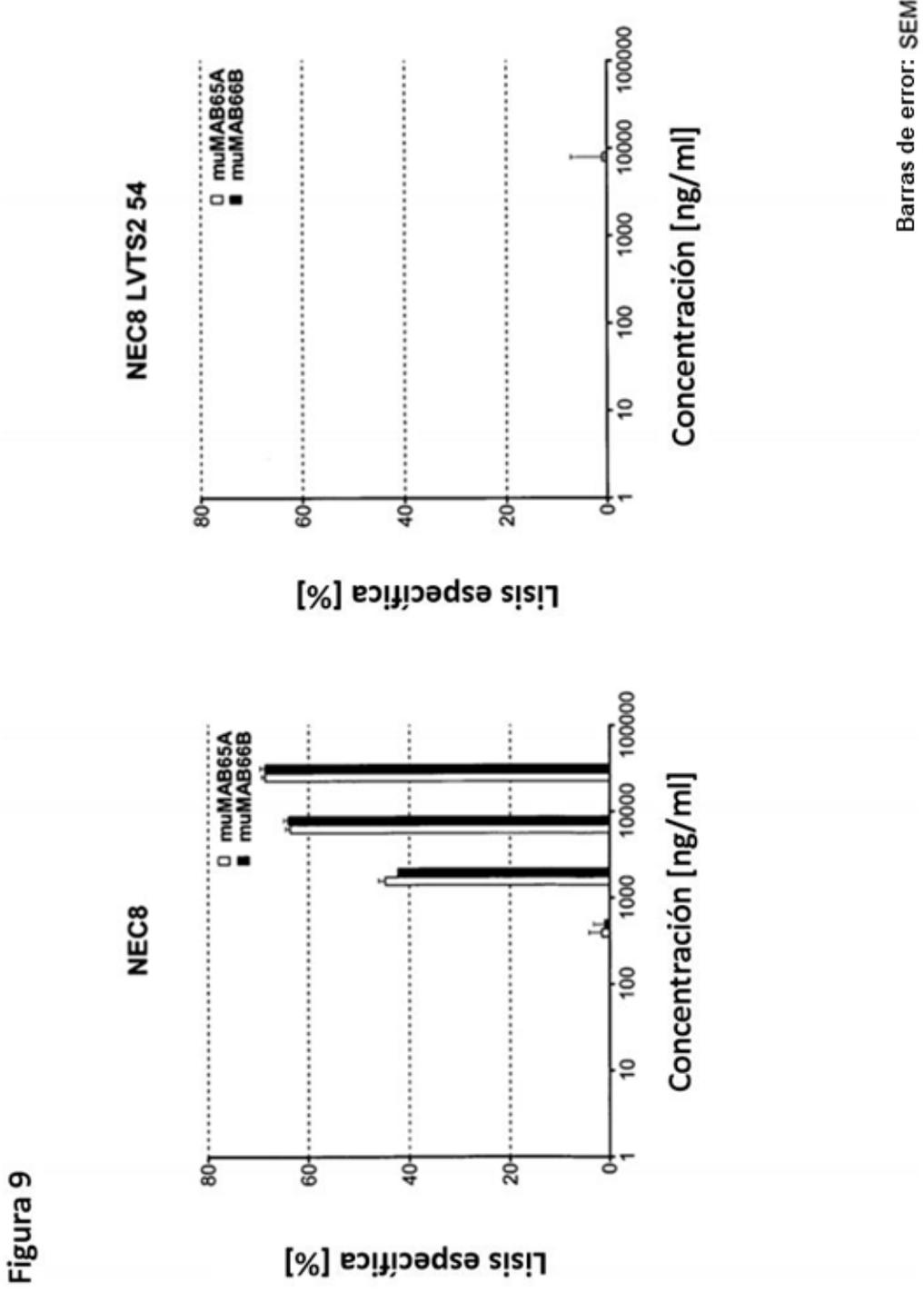


Figura 7

Figura 8





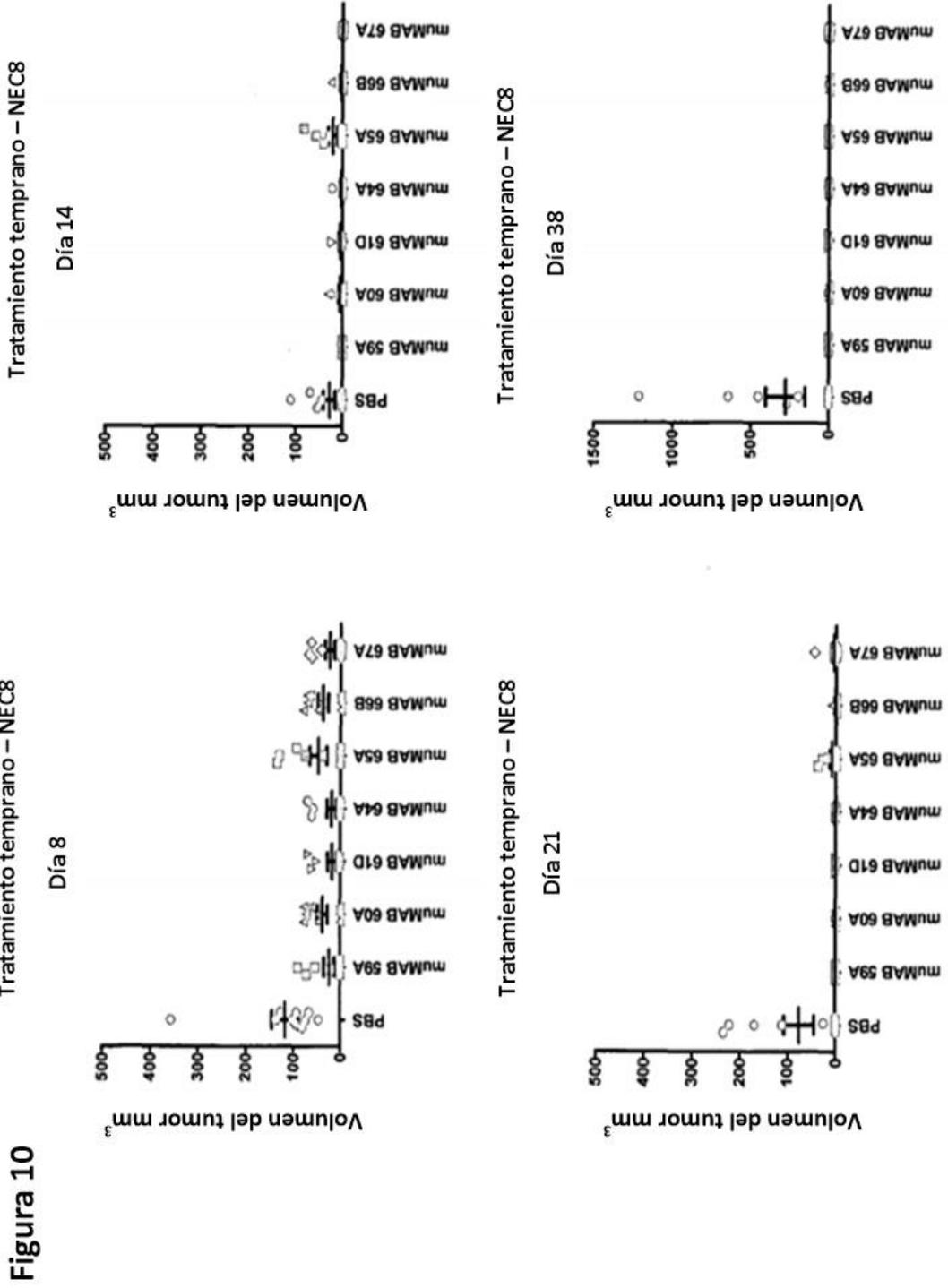


Figura 11

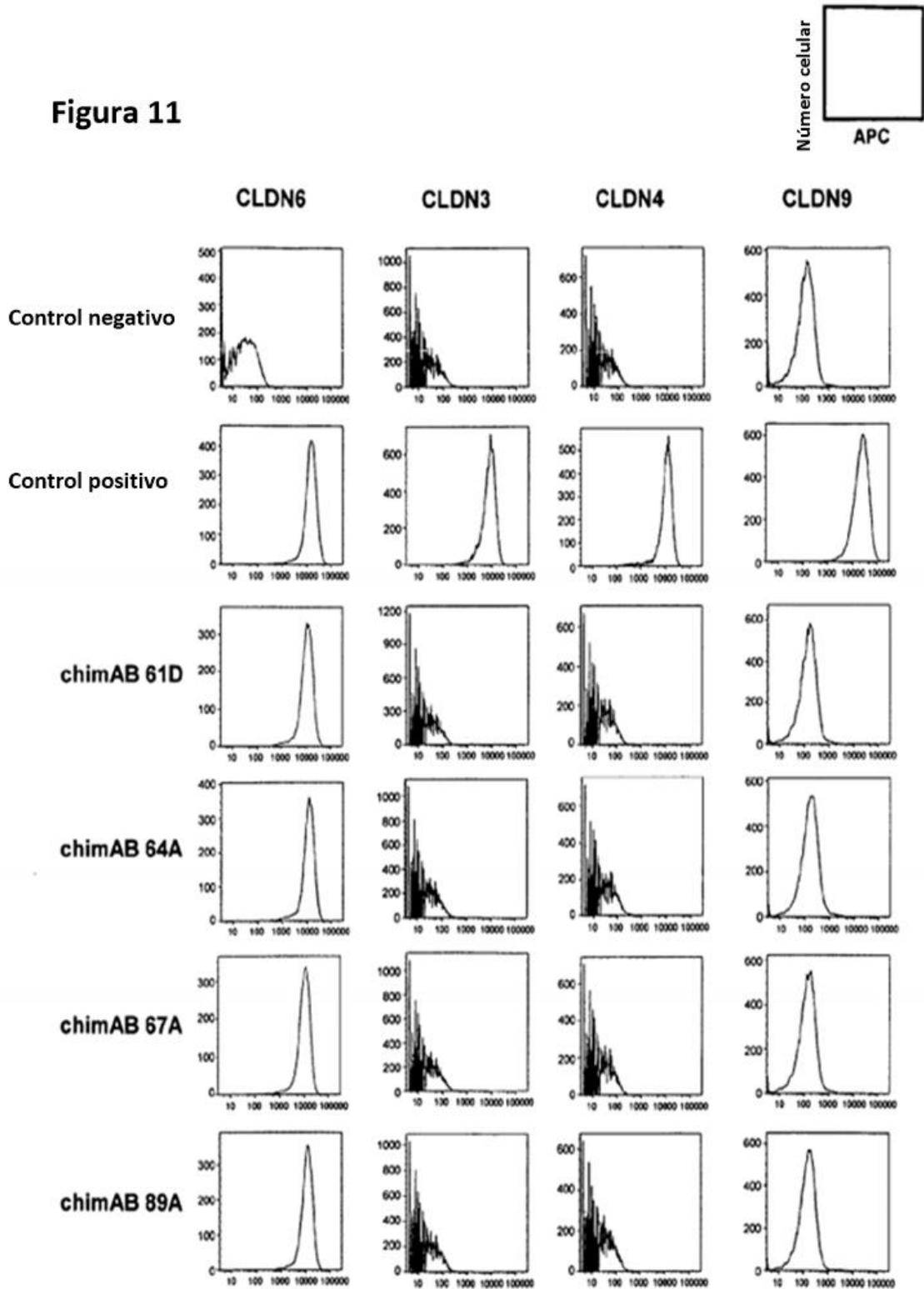


Figura 12

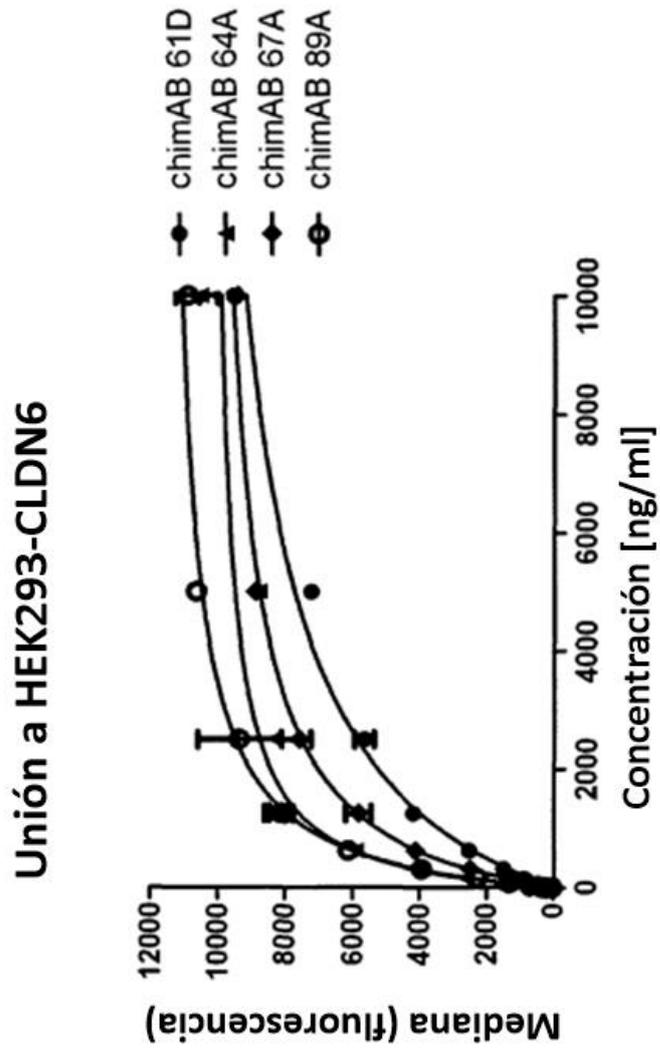


Figura 13

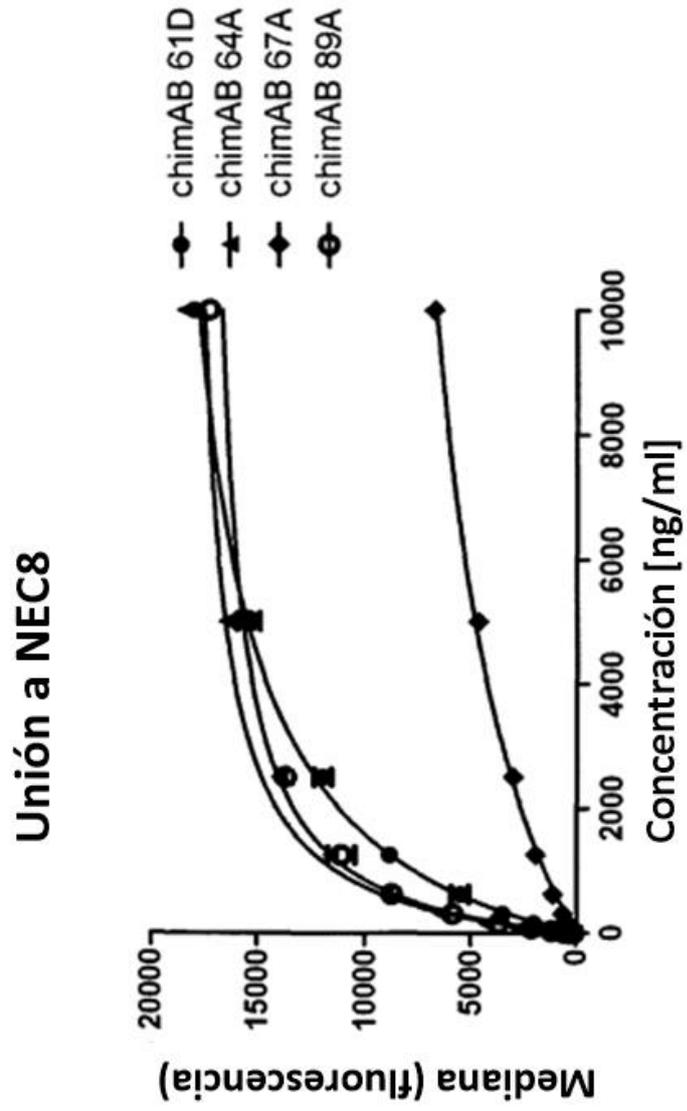


Figura 14

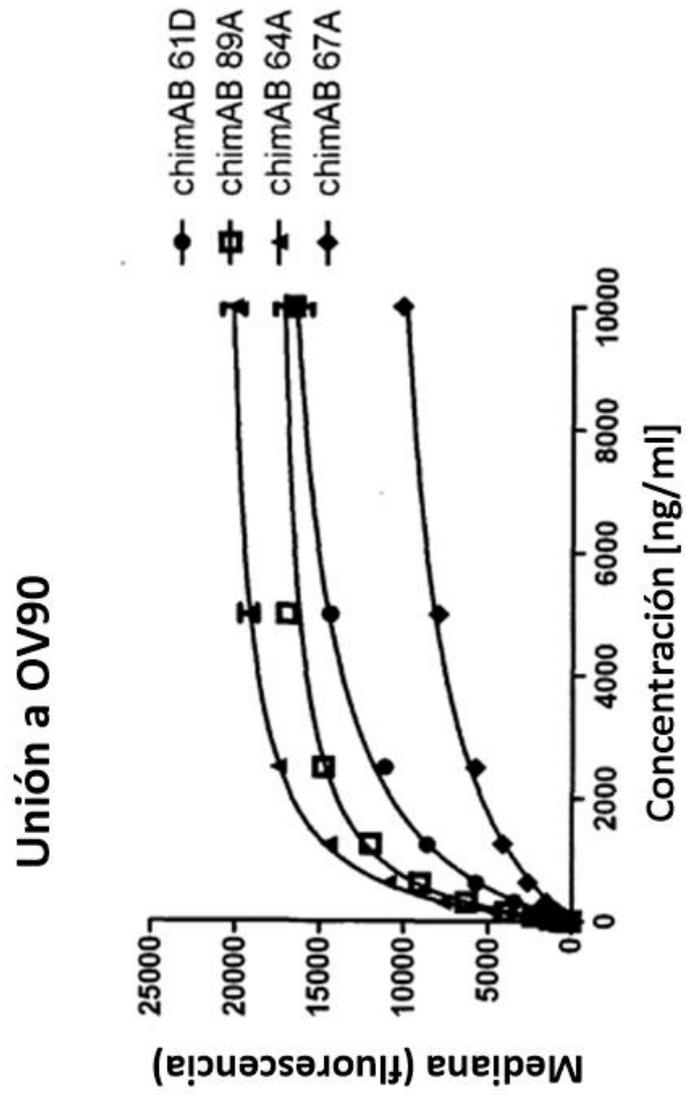


Figura 15

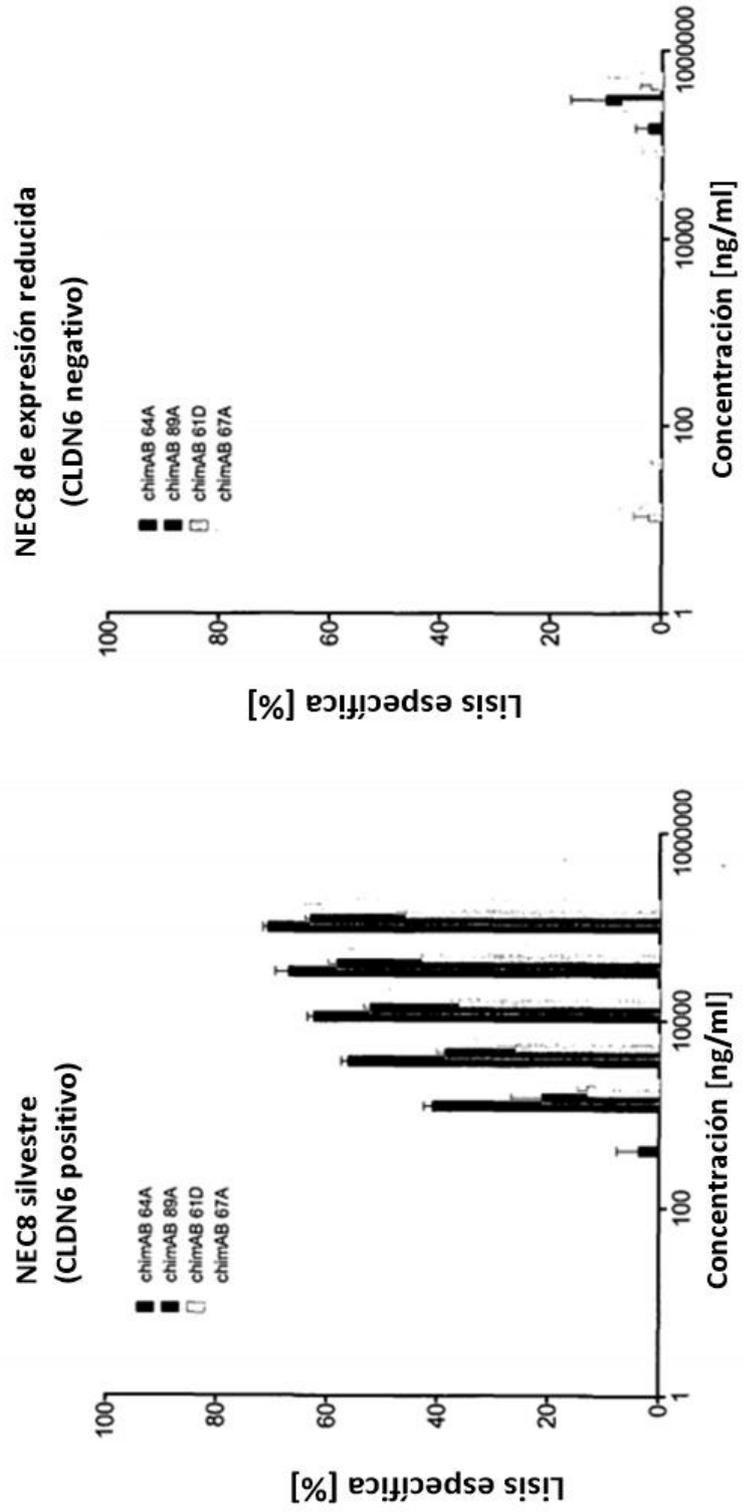


Figura 16

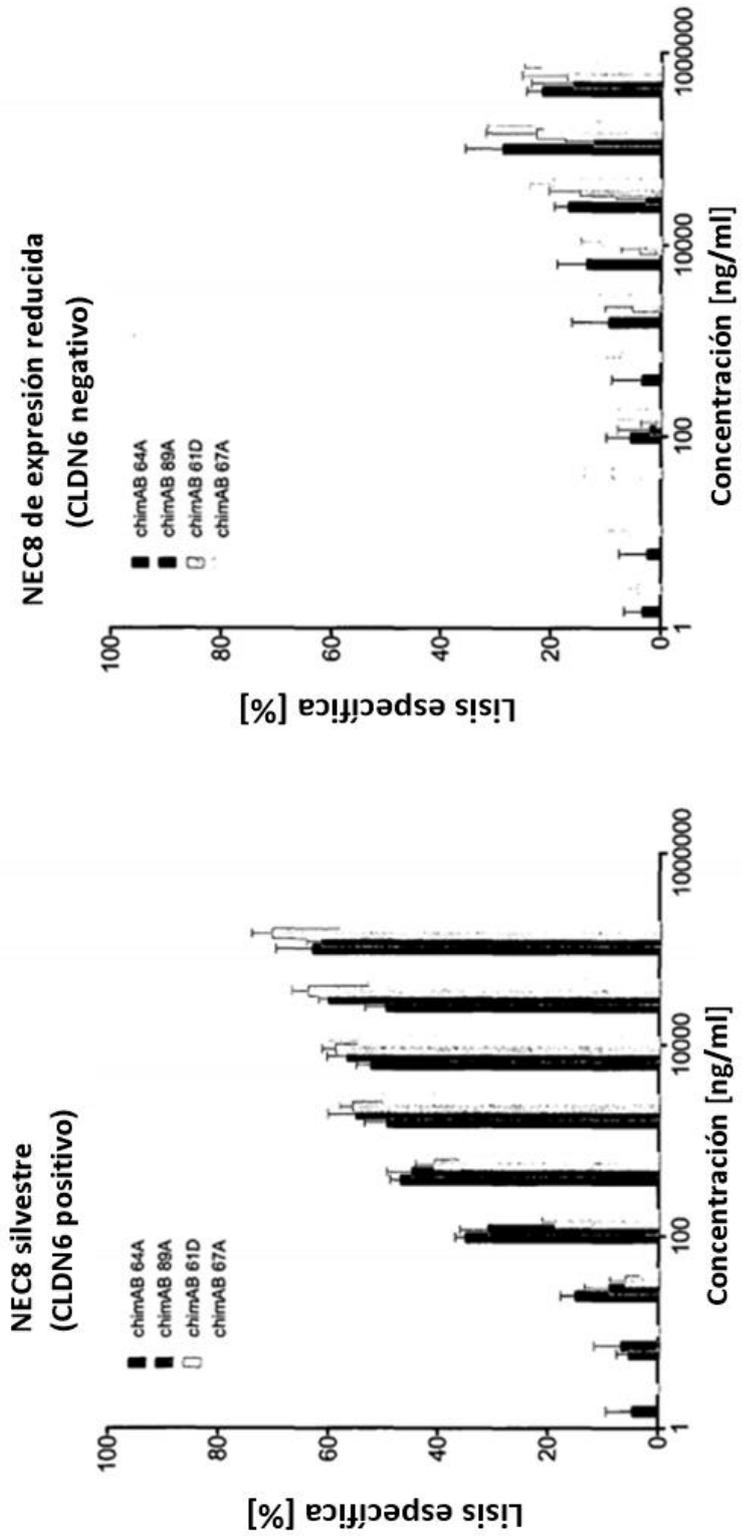


Figura 17

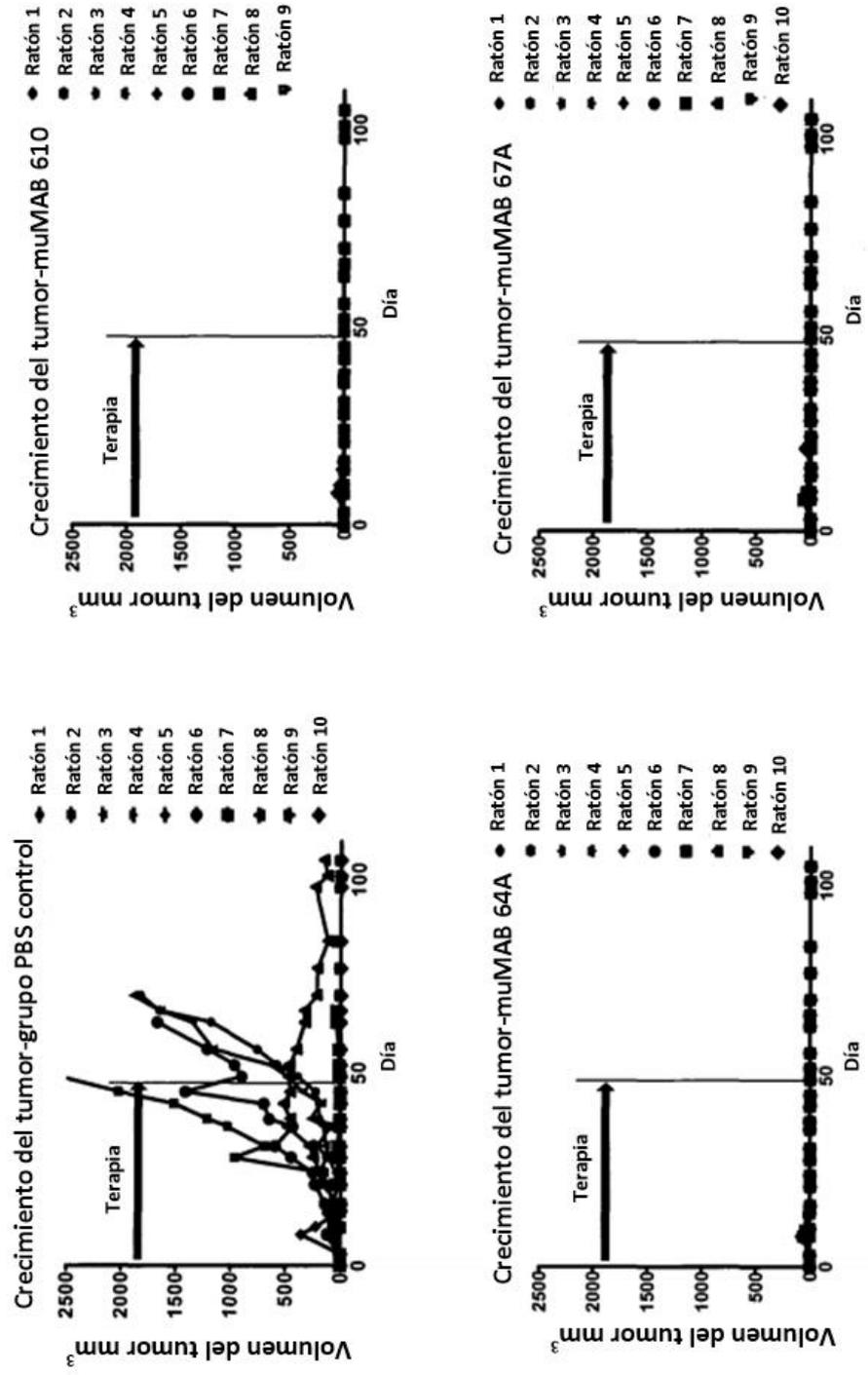
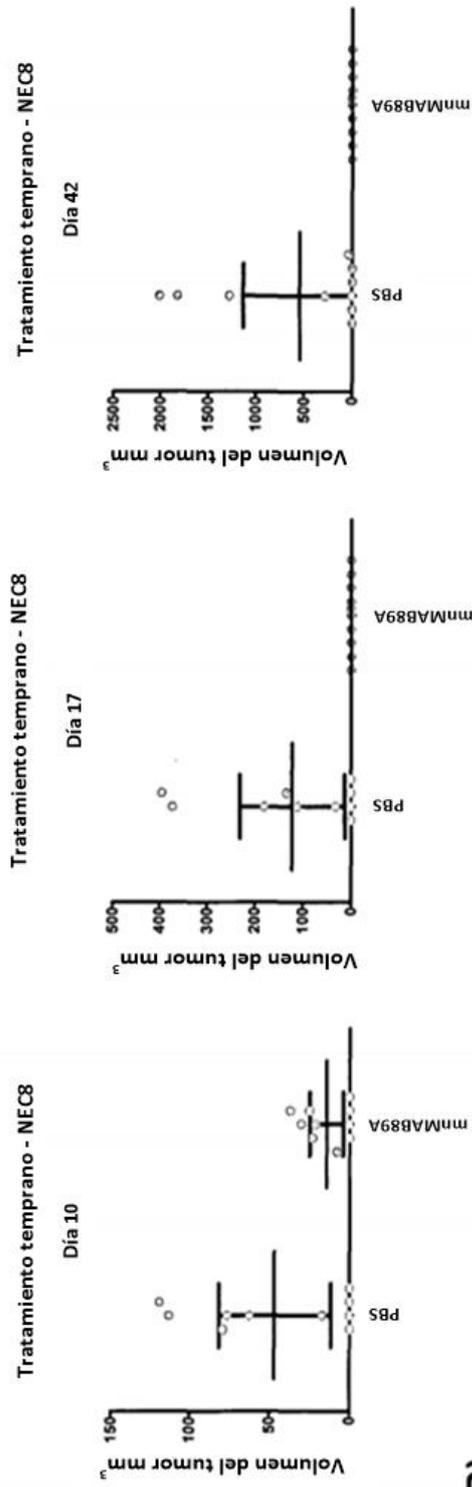


Figura 18

(A)



(B)

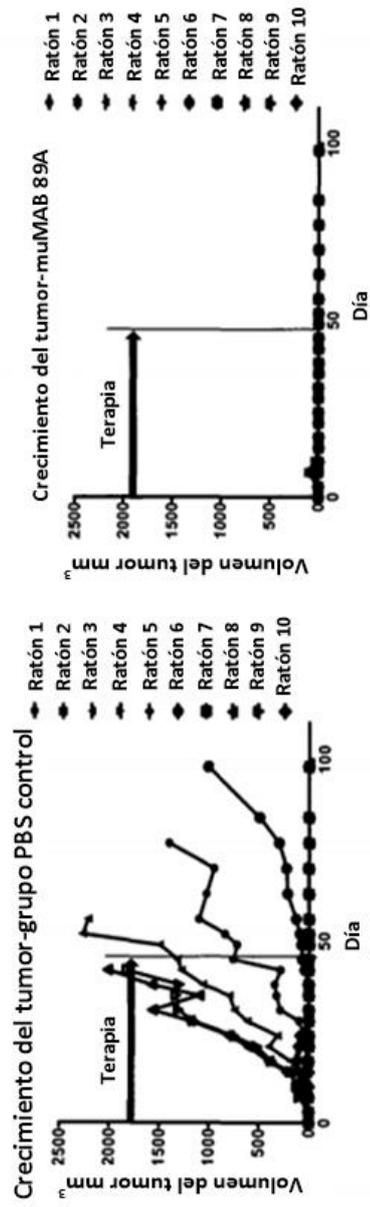


Figura 19

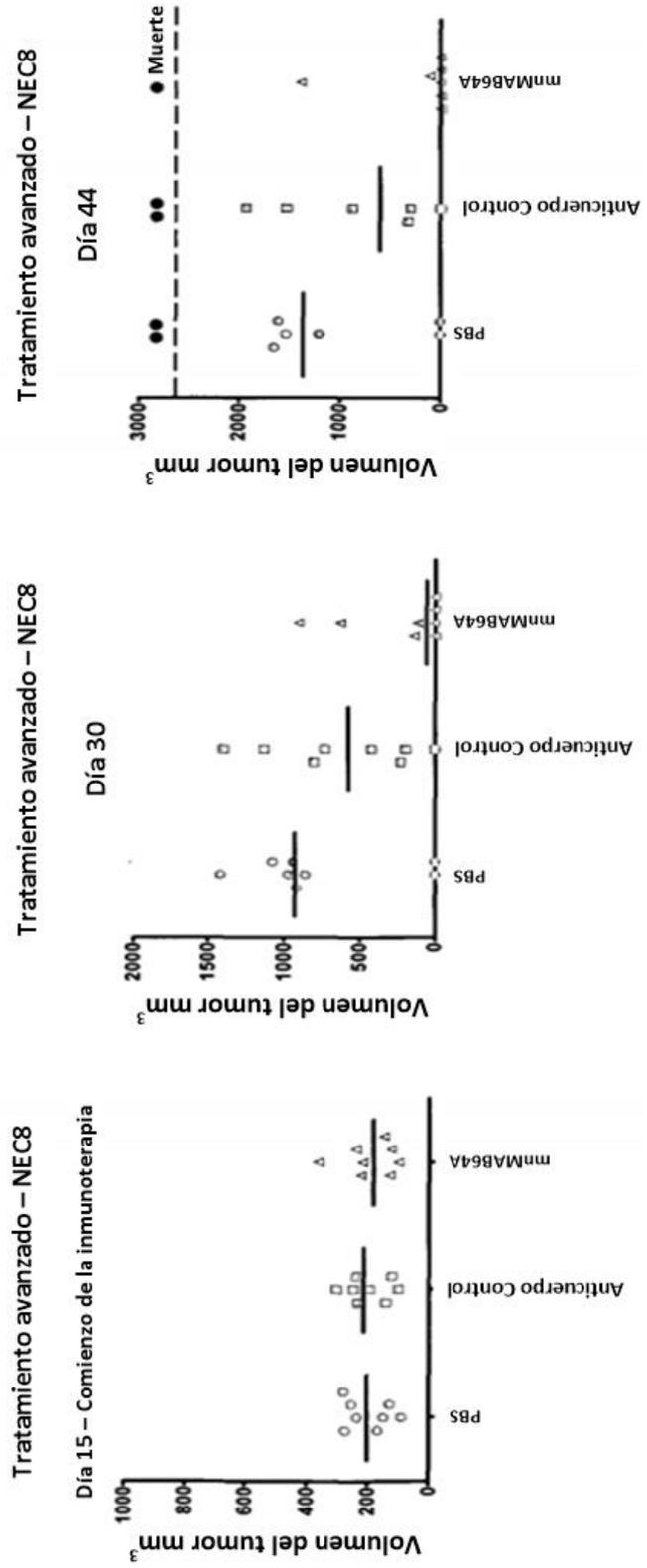


Figura 20

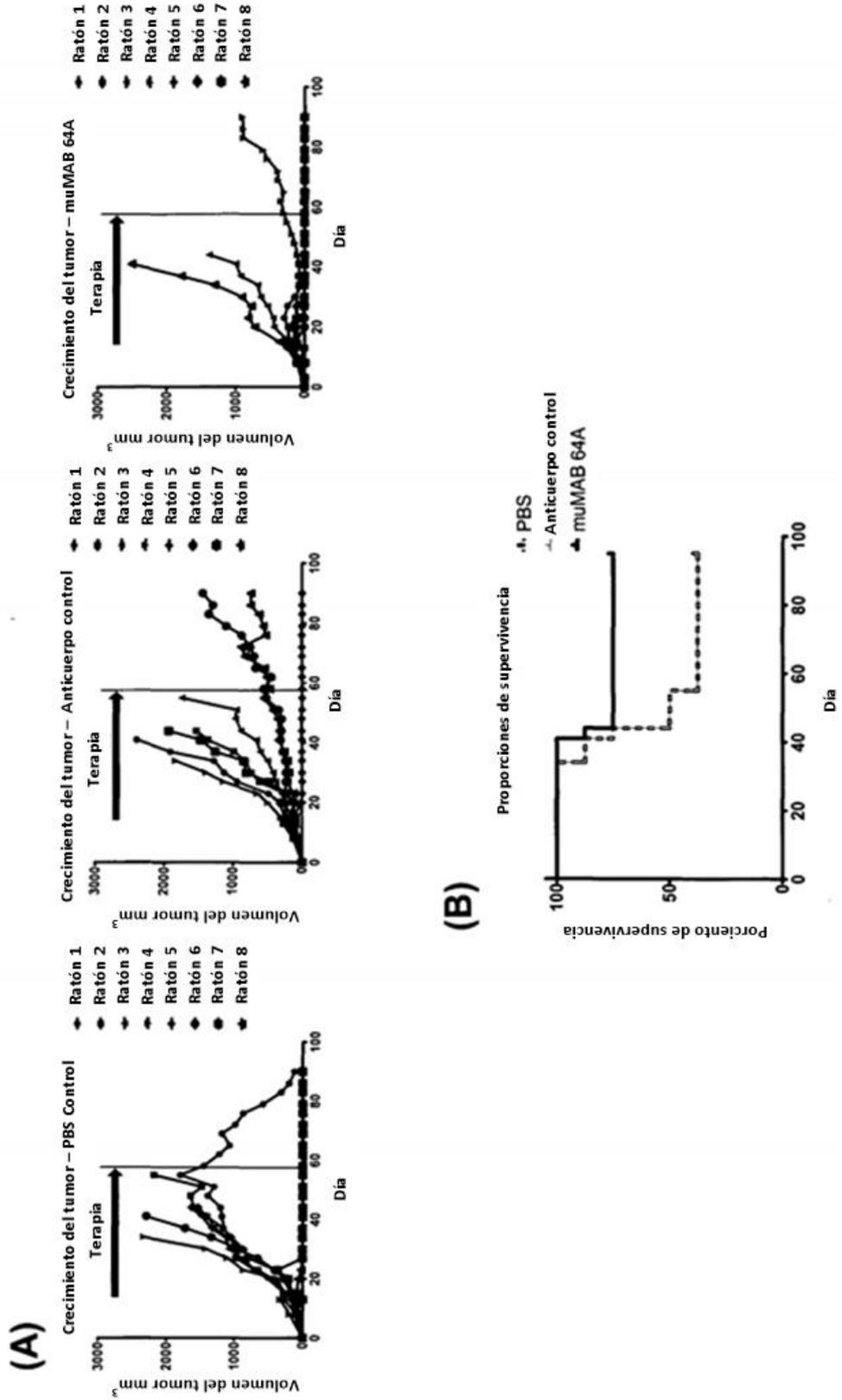


Figura 21

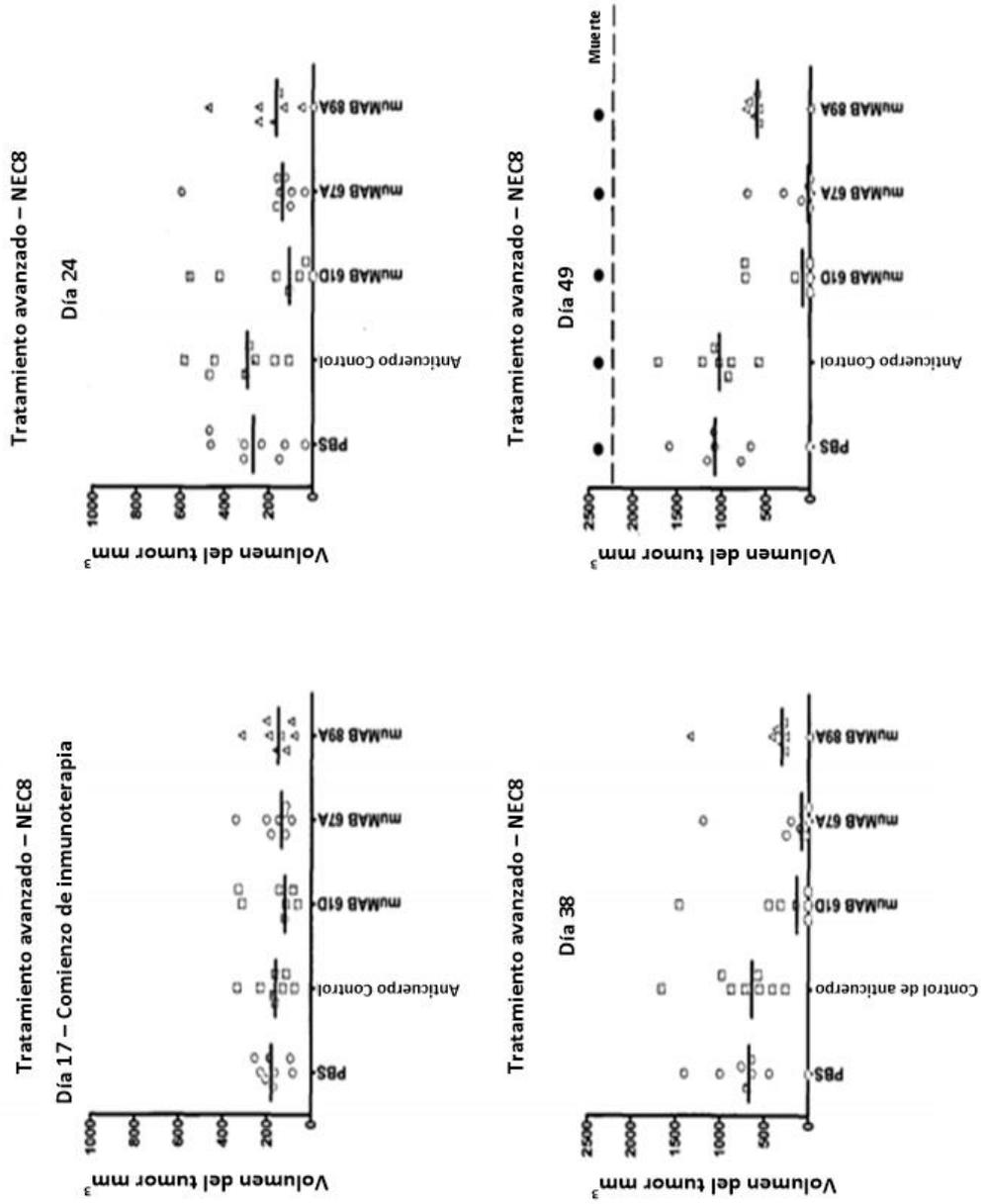


Figura 22

(A)

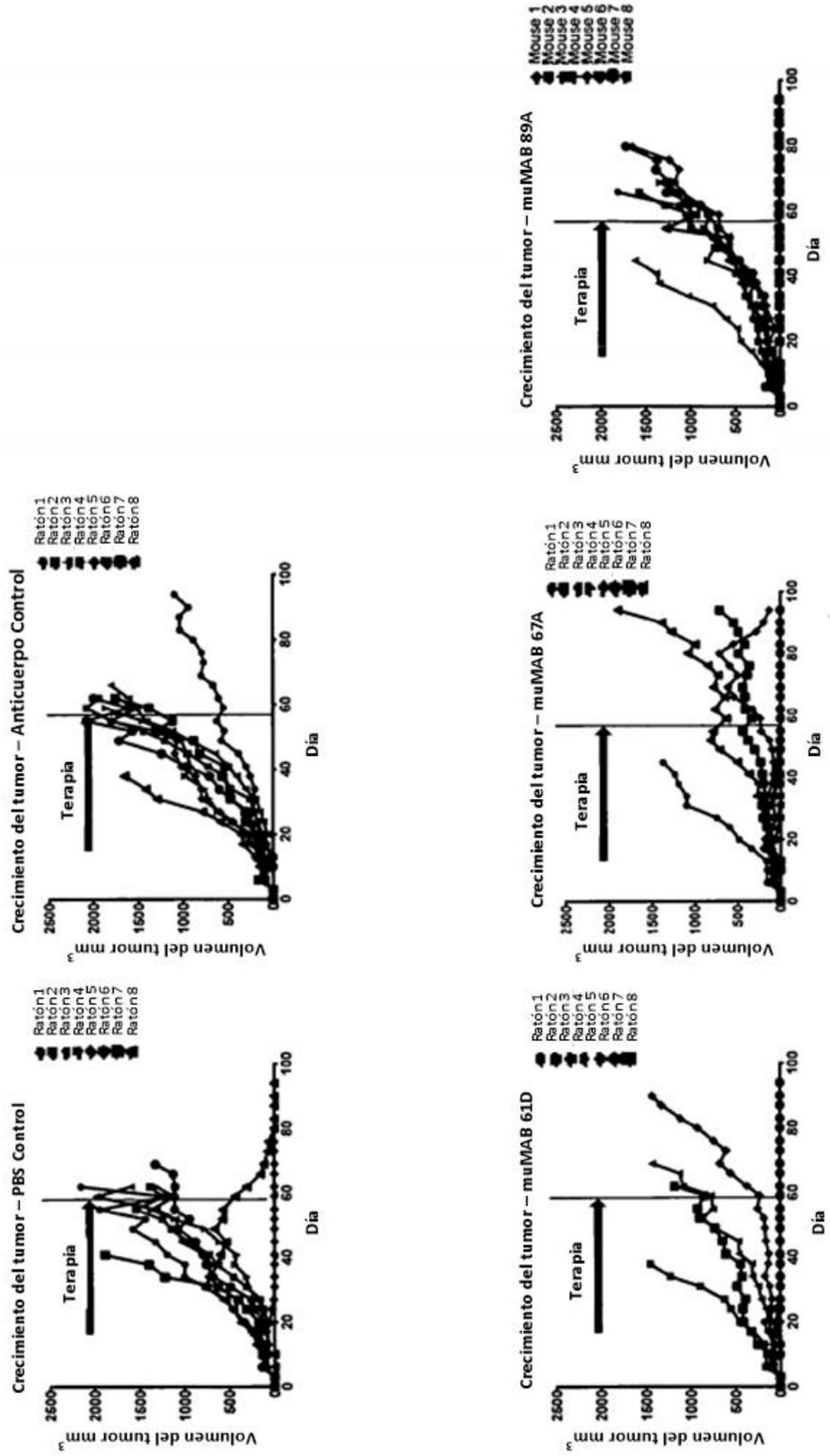


Figura 22

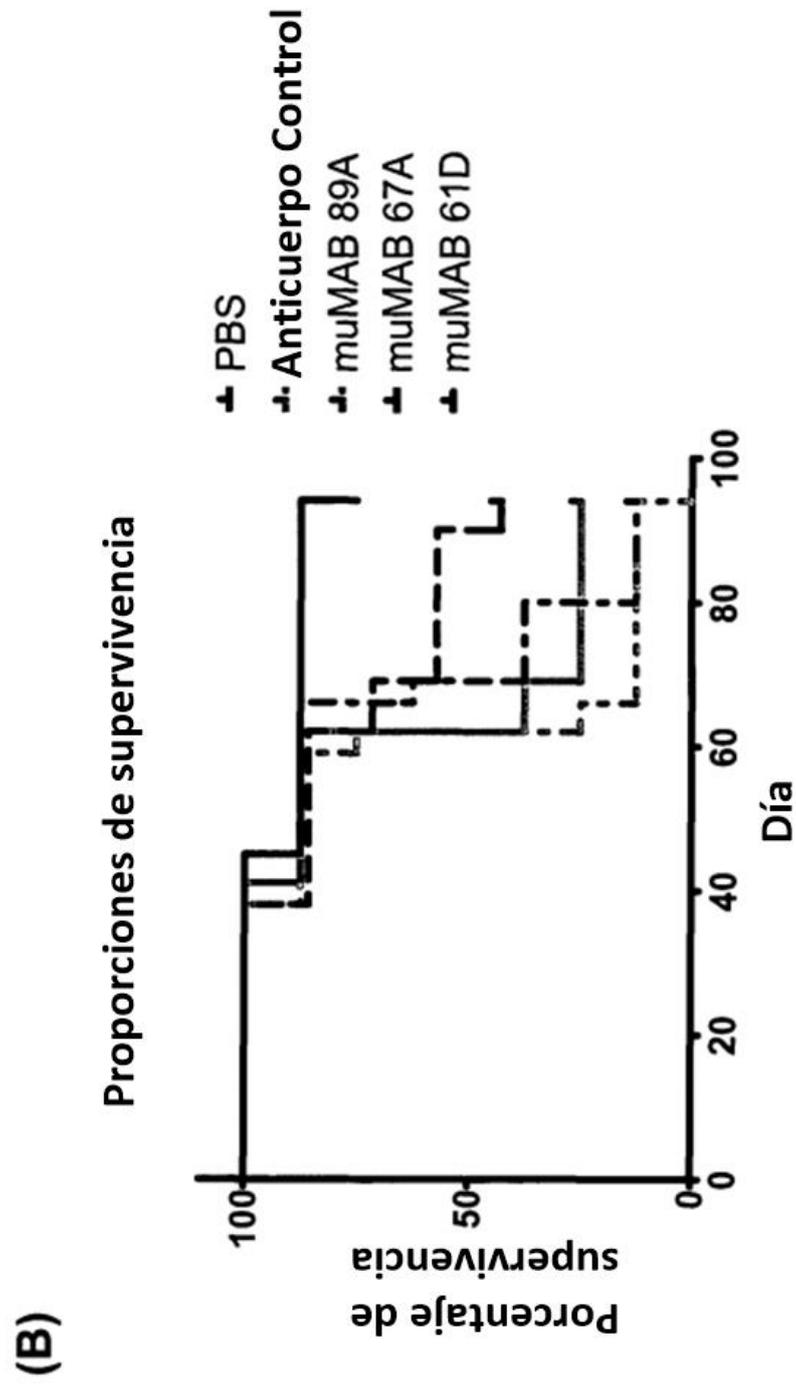


Figura 23

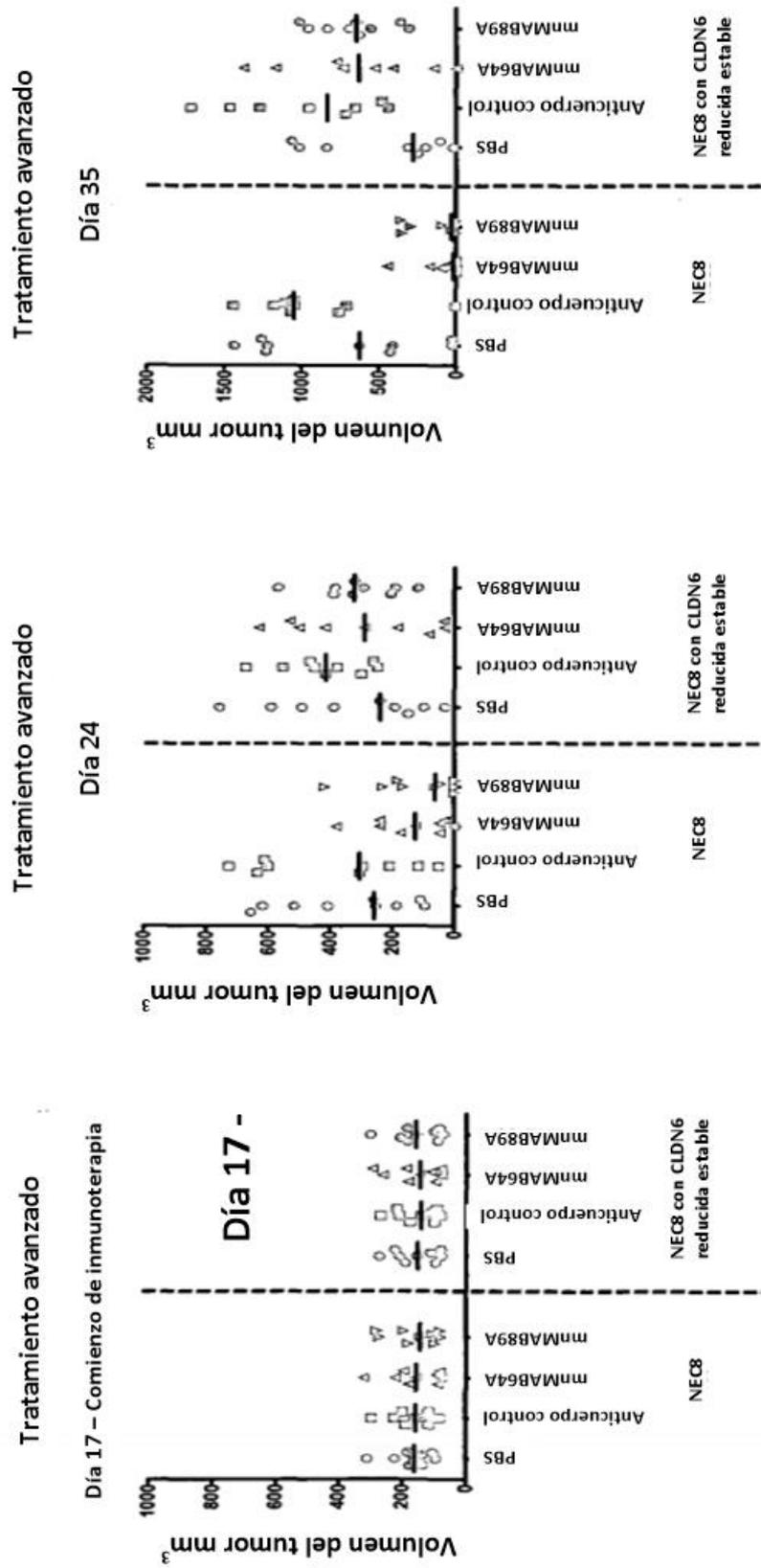


Figura 25

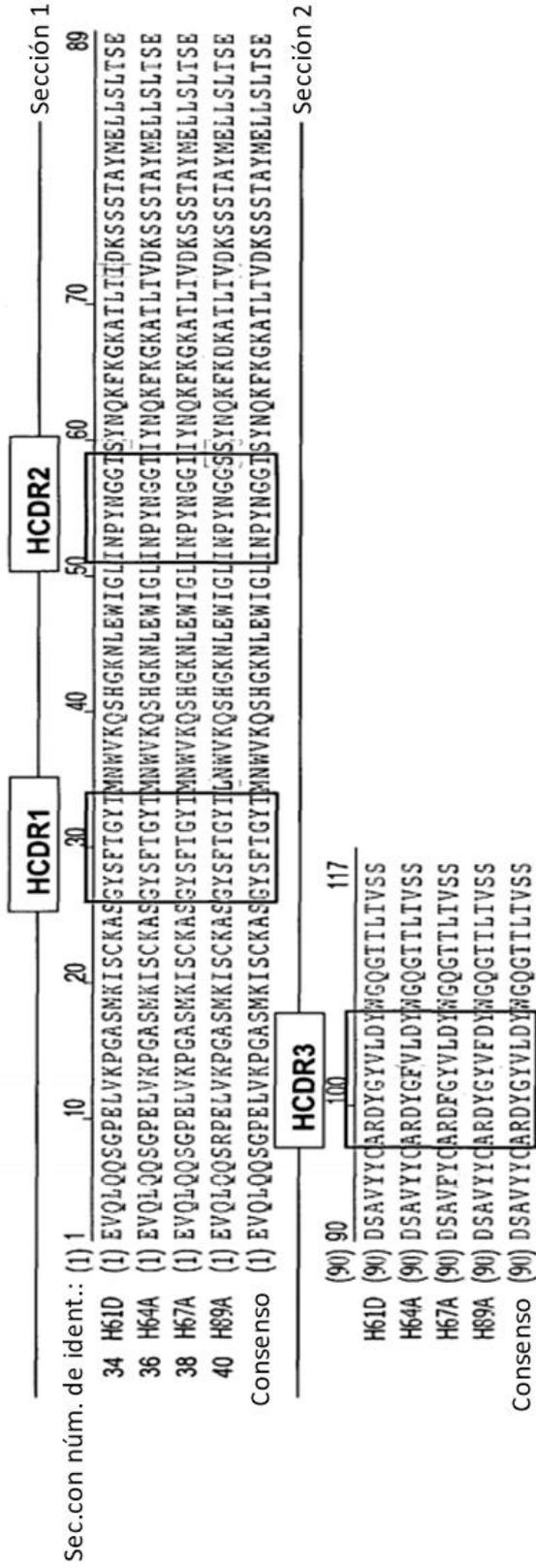


Figura 26

