

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 965**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2013 PCT/EP2013/001331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2013 E 13721596 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2847225**

54 Título: **Anticuerpos contra claudina 18.2 útiles en el diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

**09.05.2012 WO PCT/EP2012/001991**

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

**01.06.2020**

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)  
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-Chome, Chuo-ku  
Tokyo 103-8411, JP y  
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES  
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ  
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;  
TÜRECI, ÖZLEM;  
MITNACHT-KRAUS, RITA y  
WÖLL, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 763 965 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 contra claudina 18.2 útiles en el diagnóstico de cáncer

5 Las claudinas son proteínas integrales de membrana ubicadas dentro de las uniones estrechas de 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 claudina (CLDN) de proteínas transmembrana juega un papel crítico en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y también podría desempeñar un papel en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular.

10 La molécula de claudina 18 (CLDN18) es una proteína transmembrana integral (tetraspanina) que tiene cuatro regiones hidrófobas que abarcan la membrana y dos bucles extracelulares (bucle1 abrazado por la región hidrófoba 1 y la región hidrófoba 2; el bucle 2 abrazado por las regiones hidrófobas 3 y 4). La CLDN18 existe en dos variantes de empalme diferentes, que se describen en ratones y en humanos (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001). Las variantes de empalme (número de acceso de GenBank: variante de empalme 1 (CLDN18.1): NP\_057453, NM\_016369 y la variante de empalme 2 (CLDN 18.2): NM\_001002026, NP\_001002026) tienen un peso molecular de aproximadamente 27,9/27,72 kD. Las variantes de empalme CLDN18.1 y CLDN18.2 difieren en la porción del terminal N que comprende la primera región transmembrana (TM) y el bucle1, mientras que la secuencia de proteína primaria del terminal C es idéntica; véase la Figura 1.

20 La CLDN18.1 se expresa selectivamente en células de pulmón normal, mientras que CLDN18.2 se expresa solo en células gástricas. Sin embargo, la expresión de CLDN18.2 en el estómago normal está restringida a las células diferenciadas de corta duración del epitelio estomacal. La expresión de CLDN18.2 se ha identificado en varios tejidos tumorales. Por ejemplo, se ha encontrado que CLDN18.2 se expresa en carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y tumores ENT. La CLDN18.2 es un objetivo valioso para la prevención y/o el tratamiento de tumores primarios, tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello y cánceres de vesícula biliar, y de los mismos, en particular metástasis de cáncer gástrico tal como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos.

30 La expresión diferencial de CLDN18.2 entre el cáncer y las células normales, su localización en la membrana, su ausencia de la gran mayoría de los tejidos normales relevantes para la toxicidad, su restricción de la expresión a una población celular prescindible en el estómago, células gástricas diferenciadas, que pueden ser reemplazadas por células madre del estómago negativas para el objetivo, convierte a CLDN18.2 en un objetivo atractivo para la inmunoterapia contra el cáncer y el uso de compuestos terapéuticos basados en anticuerpos para atacar a CLDN18.2 en la terapia contra el cáncer promete un alto nivel de especificidad terapéutica.

35 La aplicación clínica de los anticuerpos dirigidos contra CLDN18.2 enfrenta el obstáculo de que la CLDN18.2 humana es altamente homóloga a CLDN18.1 humana. Los anticuerpos específicos de CLDN18.2 dirigidos al dominio extracelular del terminal N de CLDN18.2 que muestran diferencias de secuencia entre CLDN18.2 humana y CLDN18.1 humana podrían establecerse con éxito. Los intentos de producir anticuerpos dirigidos a la porción del terminal N de CLDN18.2 y que tienen propiedades que los hacen clínicamente aplicables para fines de diagnóstico, por ejemplo, para la detección de la expresión de CLDN18.2 en células de secciones de tejido canceroso, fracasaron.

40 Los documentos WO2007/059997 y WO2008/145338 mencionan la producción de diversos anticuerpos terapéuticos contra epítomos del terminal N de CLDN18.2. Los documentos WO2011/113546, CN101584860 y Klamp et al., 2011 (Canc. Res. 71: 516-527) mencionan varios epítomos del terminal N de CLDN18.2 para la vacunación de tumores. Sahin et al., 2008 (Clin. Cane. Res. 14: 7624-7634) menciona un anticuerpo policlonal producido contra el péptido del terminal N DQWSTQDLYN de CLDN18.2. El documento WO2007/027867 describe sitios potenciales de fosforilación de tirosina en el terminal C de CLDN18.2.

45 Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que los anticuerpos dirigidos contra un cierto epítomo ubicado dentro de la porción terminal C de CLDN18.2 cumplen los criterios para la aplicabilidad diagnóstica de anticuerpos, en particular para detectar e identificar células que expresan CLDN18.2. Lo más sorprendente es que estos anticuerpos, aunque están dirigidos contra una secuencia que es idéntica entre CLDN18.1 y CLDN18.2, no se dirigen a las células pulmonares no cancerosas.

50 Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para diagnosticar cáncer y/o para determinar si las células cancerosas expresan CLDN18.2. Preferiblemente, una enfermedad cancerosa o una célula cancerosa se caracteriza por la expresión superficial de CLDN18.2. Las células cancerosas que expresan CLDN18.2 son objetivos adecuados para terapias dirigidas a CLDN18.2, tal como la terapia con anticuerpos dirigida contra CLDN18.2. En una realización, las células cancerosas expresan o expresan aberrantemente CLDN18.2 mientras que las células normales correspondientes no expresan CLDN18.2 o expresan CLDN18.2 en un nivel inferior. Las células que expresan CLDN18.2 se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en células cancerígenas tumorigénicas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que (i) se une a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 5) o EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 6) y/o (ii) se une a claudina 18.2 (CLDN18.2), en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CLDN18.2 mediante la unión a al menos un epítipo dentro de CLDN18.2 que tiene la secuencia de aminoácidos TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 5) o EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 6).

En una realización, dicha CLDN18.2 es una CLDN18.2 unida a la membrana de la superficie celular. En una realización, dicha CLDN18.2 está presente en células cancerosas, en las que dichas células cancerosas son preferiblemente células cancerosas que expresan CLDN18.2. En una realización, dichas células cancerosas se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención no se une a células no cancerosas excepto las células epiteliales del estómago. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención no se une a células pulmonares no cancerosas. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal.

En estos y otros aspectos, la presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende:

(I) una cadena pesada de anticuerpo que comprende:

(i) una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma,

(ii) en al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma, o

(iii) una secuencia de CDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 o una variante de la misma y preferiblemente que comprende además una secuencia de CDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma y/o una secuencia de CDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma,

y/o

(II) una cadena ligera de anticuerpo que comprende:

(i) una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma,

(ii) al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 11 o una variante de la misma, o

(iii) una secuencia de CDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 o una variante de la misma y que preferiblemente comprende además una secuencia de CDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 o una variante de la misma y/o una secuencia de CDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 o una variante de la misma.

En los aspectos anteriores y adicionales, la presente invención también se refiere a un anticuerpo que comprende:

(I) una cadena pesada de anticuerpo que comprende:

(i) una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 15 o una variante de la misma,

(ii) al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 15 o una variante de la misma, o

(iii) una secuencia de CDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 18 o una variante de la misma y que preferiblemente comprende además una secuencia de CDR1 de acuerdo con SEQ ID NO: 16 o una variante de la misma y/o una secuencia de CDR2 de acuerdo con SEQ ID NO: 17 o una variante de la misma,

y/o

(II) una cadena ligera de anticuerpos que comprende:

(i) una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de acuerdo con la SEQ ID NO: 19 o una variante de la misma,

(ii) al menos una, preferiblemente dos, más preferiblemente las tres secuencias CDR de una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de acuerdo con SEQ ID NO: 19 o una variante del mismo, o

(iii) una secuencia CDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 22 o una variante de la misma y que preferiblemente comprende además una secuencia CDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 20 o una variante de la misma y/o una secuencia CDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 21 o un variante del mismo.

En realizaciones preferidas, un anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región constante de cadena pesada de gamma-1, preferiblemente una región constante de cadena pesada de

gamma-1 humana y/o comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende una región constante de cadena ligera kappa.

5 En los aspectos anteriores y adicionales, la presente invención se refiere a un anticuerpo producido por u obtenible a partir de una célula de hibridoma depositada en el DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) y que tiene una de las siguientes designaciones y números de acceso:

1. muAB 43-14A, no. de acceso DSM ACC3144, depositado el 6 de octubre de 2011; o
2. muAB 35-22A, no. de acceso DSM ACC3143, depositado el 6 de octubre de 2011.

Los anticuerpos de la invención se designan en el presente documento haciendo referencia a la designación del anticuerpo y/o haciendo referencia al clon que produce el anticuerpo, por ejemplo muAB 43-14A.

10 Los anticuerpos preferidos adicionales son aquellos que tienen la especificidad de los anticuerpos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente y, en particular, aquellos que comprenden una porción de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno, en particular una región variable, idéntica o altamente homóloga a aquella de los anticuerpos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente. Se contempla que los anticuerpos preferidos son aquellos que tienen regiones CDR idénticas o altamente homólogas a las regiones CDR de anticuerpos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones se pueden hacer en cada región CDR. Los anticuerpos particularmente preferidos son las formas quimerizadas y humanizadas de los anticuerpos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente.

20 Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en (i) un anticuerpo producido por u obtenible a partir de un clon depositado bajo el número de acceso no. DSM ACC3144 (muAB 43-14A) o DSM ACC3143 (muAB 35-22A), (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo bajo (i), (iii) un anticuerpo que tiene la especificidad del anticuerpo bajo (i) y (iv) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo bajo (i). La porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo bajo (i) puede comprender la región variable del anticuerpo bajo (i). Además, la presente invención abarca fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en este documento.

25 Un anticuerpo de la invención puede unirse preferiblemente a CLDN18.2 en su estado nativo, es decir, natural o no desnaturalizado, o en su estado desnaturalizado.

30 En una realización, un anticuerpo de la invención se puede obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con un péptido que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, o un péptido inmunológicamente equivalente, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicho péptido. Preferiblemente dicho péptido comprende no más de 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o 20 aminoácidos contiguos de CLDN18.2.

35 En una realización, un anticuerpo de la invención se puede obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con un péptido que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 25, o un péptido inmunológicamente equivalente, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicho péptido. Preferiblemente dicho péptido comprende no más de 110, 100, 90, 80 o 75 aminoácidos contiguos de CLDN18.2.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden estar acoplados, es decir, unidos covalentemente o no covalentemente, a otras fracciones tales como marcadores detectables.

40 La presente invención también se refiere a una célula tal como una célula de hibridoma que produce un anticuerpo como se describe en el presente documento.

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

- 45 1. muAB 43-14A, no. de acceso DSM ACC3144, depositado el 6 de octubre de 2011; o
2. muAB 35-22A, no. de acceso DSM ACC3143, depositado el 6 de octubre de 2011.

La presente invención también se refiere a un péptido que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, o un péptido inmunológicamente equivalente. Preferiblemente dicho péptido comprende no más de 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o 20 aminoácidos contiguos de CLDN18.2.

50 La presente invención también se refiere a un péptido que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 24 o la SEQ ID NO: 25, o un péptido inmunológicamente equivalente, o un ácido nucleico o una célula huésped que expresa dicho péptido. Preferiblemente dicho péptido comprende no más de 110, 100, 90, 80 o 75 aminoácidos contiguos de CLDN18.2.

La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo, una cadena de anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno, o péptidos como se describe en el presente documento. Preferiblemente, el ácido nucleico de la invención está unido operativamente a elementos de control de expresión que permiten la expresión en células eucariotas o procariotas. Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas o procariotas son bien conocidos por los expertos en la materia.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden estar comprendidos en un vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender además genes tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de expresión que permiten la expresión adecuada de las regiones de codificación en huéspedes adecuados. Dichos elementos de control son conocidos por los expertos y pueden incluir un promotor, un casete de empalme y un codón de iniciación de la traducción.

Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico, para la construcción de vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico, para la introducción de vectores en células huésped apropiadamente elegidas, o para provocar o lograr la expresión de moléculas de ácido nucleico son bien conocidas en la técnica.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con la detección de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 o la determinación de la cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Se detectan CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 o se determina la cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 detectando o determinando la cantidad de un complejo entre CLDN18.2 y un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. La formación de un complejo indica la presencia de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2. Dicha detección o determinación de la cantidad puede llevarse a cabo de varias maneras, que incluyen pero no se limitan a inmunodetección usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Los métodos para usar anticuerpos para detectar péptidos o proteínas son bien conocidos e incluyen ELISA, ensayos de unión competitiva y similares. En general, tales ensayos usan un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido o proteína objetivo directamente o indirectamente unido a un marcador que permite la detección, por ejemplo, enzimas indicadoras, radiomarcadores, fluoróforos o partículas paramagnéticas. Los métodos de la invención permiten evaluaciones cuantitativas y/o cualitativas, por ejemplo, evaluaciones absolutas y/o relativas, de niveles de CLDN18.2 o de niveles de células que expresan CLDN18.2.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar CLDN18.2 o determinar la cantidad de CLDN18.2 en una muestra que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una muestra con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o un conjugado de la invención y
- (ii) detectar la formación de un complejo o determinar la cantidad de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2.

En una realización, la muestra es una muestra celular, es decir, una muestra que comprende células tales como células cancerosas. En esta realización, el complejo se forma preferiblemente entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresado por las células en dicha muestra.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar si las células expresan CLDN18.2 que comprende las etapas de:

- (i) poner en contacto una muestra celular con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o un conjugado de la invención y
- (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresada por las células en dicha muestra.

En una realización, las células en la muestra son células cancerosas. El complejo se forma preferiblemente entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresada por las células en dicha muestra.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a métodos para diagnosticar o clasificar enfermedades mediante el ataque de CLDN18.2 usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Estos métodos permiten la detección selectiva de células que expresan CLDN18.2, diferenciando así estas células de las células normales que no expresan CLDN18.2 o las células enfermas que no expresan CLDN18.2. Las enfermedades caracterizadas por células enfermas que expresan CLDN18.2 pueden ser tratadas mediante una terapia dirigida a CLDN18.2 tal como la terapia con anticuerpos terapéuticos dirigidos contra CLDN 18.2. Las enfermedades preferidas para una terapia o diagnóstico son aquellas en las que CLDN18.2 se expresa o se expresa de manera aberrante, en particular enfermedades cancerosas, tales como aquellas descritas en el presente documento.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico, detección o monitorización, es decir, determinar la regresión, progresión, curso y/o aparición de una enfermedad cancerosa que comprende la detección de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 y/o determinación de la cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 en una muestra biológica aislada de un paciente usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Tales métodos se pueden usar para detectar si un sujeto tiene una enfermedad cancerosa o si tiene un riesgo (mayor) de desarrollar una enfermedad cancerosa o, por ejemplo, si un régimen de tratamiento es eficiente.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico, detección o monitorización de cáncer que comprende las etapas de:

10 (i) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención o un conjugado de la invención y

(ii) detectar la formación de un complejo y/o determinar la cantidad de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2.

15 En una realización, la muestra biológica es una muestra celular, es decir, una muestra que comprende células tales como células cancerosas. En esta realización, el complejo se forma preferiblemente entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresada por las células en dicha muestra.

Los métodos de monitorización de acuerdo con la invención comprenden preferiblemente una detección y/o determinación de la cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 en una primera muestra en un primer punto en el tiempo y en una muestra adicional en un segundo punto en el tiempo, en el que la regresión, progresión, curso y/o aparición de una enfermedad tumoral se puede determinar comparando las dos muestras.

20 Típicamente, el nivel de CLDN18.2 o el nivel de células que expresan CLDN18.2 en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en el que una desviación de dicho nivel de referencia es indicativo de la presencia y/o etapa de una enfermedad cancerosa en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel como el determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano, en particular un paciente sin una enfermedad cancerosa) o un nivel medio de sujetos sanos. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, tal como un aumento de al menos 10%, 20% o 30%, preferiblemente al menos 40% o 50%, o incluso más.

Preferiblemente, la presencia de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 y/o una cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 que aumenta en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, en comparación con un paciente sin una enfermedad por cancerosa, indica la presencia o el riesgo de (es decir, un potencial para el desarrollo de) una enfermedad cancerosa en el paciente.

30 Una cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 que se reduce en comparación con una muestra biológica tomada anteriormente de un paciente puede indicar una regresión, un curso positivo, por ejemplo, un tratamiento exitoso o un riesgo reducido para el inicio de una enfermedad cancerosa en un paciente.

35 Una cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 que se incrementa en comparación con una muestra biológica tomada anteriormente de un paciente puede indicar una progresión, un curso negativo, por ejemplo, un tratamiento fallido, recurrencia o comportamiento metastásico, un inicio o un riesgo de aparición de una enfermedad cancerosa en dicho paciente.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar si un cáncer es tratable mediante una terapia contra el cáncer dirigida a CLDN18.2 que comprende las etapas de:

40 (i) poner en contacto una muestra que comprende células cancerosas con un anticuerpo o antígeno fragmento de la invención o un conjugado de la invención y

(ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2.

El complejo se forma preferiblemente entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresada por células cancerosas en dicha muestra.

45 Tales métodos pueden usarse para detectar si un paciente es adecuado para una terapia que implica el ataque de células que expresan CLDN18.2 tal como una terapia que usa anticuerpos que ejercen una o más funciones efectoras inmunes tales como anticuerpos citotóxicos específicos para CLDN18.2, por ejemplo, anticuerpos marcados con una sustancia citotóxica como una toxina o un radiomarcador o que inducen un mecanismo de destrucción celular tal como los CDC o ADCC. Las enfermedades caracterizadas por células enfermas que expresan CLDN18.2 son tratables mediante una terapia dirigida a CLDN18.2 tal como enfermedades cancerosas, en particular las descritas en el presente documento.

50 En una realización de cualquiera de los aspectos anteriores, la muestra, la muestra celular o la muestra biológica es de un paciente que tiene una enfermedad cancerosa, que se sospecha que tiene o que está enferma con una enfermedad cancerosa o que tiene potencial para una enfermedad cancerosa. En una realización, la muestra, muestra celular o muestra biológica es de un tejido u órgano en el que las células cuando el tejido u órgano está libre de cáncer no expresan sustancialmente CLDN18.2. Preferiblemente dicho tejido es un tejido distinto del tejido del estómago. Preferiblemente,

dicho tejido es tejido de pulmón, esófago, páncreas o mama y el tejido u órgano opcionalmente ya ha sido diagnosticado como afectado por una enfermedad cancerosa, por ejemplo, mediante inspección visual o pruebas de cultivo de células de dicho tejido u órgano. En esta realización, la presencia de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 y una cantidad de CLDN18.2 o células que expresan CLDN18.2 que se incrementa en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, comparado con un paciente sin enfermedad tumoral, puede indicar que un paciente es adecuado para una terapia que involucra el ataque de células que expresan CLDN18.2.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones de diagnóstico, o kits, que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o una combinación de anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Dichas composiciones de diagnóstico o kits de prueba son útiles en los métodos de la invención, tales como los métodos de diagnóstico, detección o monitorización de la invención. Estos kits pueden comprender opcionalmente un marcador detectable, por ejemplo, enzimas indicadoras, radiomarcadores, fluoróforos o partículas paramagnéticas. Los kits pueden incluir panfletos informativos, por ejemplo, panfletos que informan cómo usar reactivos para practicar un método divulgado en el presente documento.

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

#### Descripción detallada de la invención

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en este documento, ya que pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la materia.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos y las realizaciones preferidas descritos de manera diversa no deben interpretarse para limitar la presente invención solo a las realizaciones descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción soporta y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", HGW Leuenberger, B. Nagel y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

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

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprende" y variaciones tales como "que comprende" implican la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas establecidas, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones se puede excluir dicho otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas establecidos. Los términos "un" y "uno, una" y "el, la" y una referencia similar utilizada en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) debe interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. La mención de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en este documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o ejemplos de expresiones (por ejemplo, "tal como"), proporcionados en el presente documento tiene la intención meramente de ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica un elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluidas todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea citados anteriormente o más adelante, se incorporan en el presente documento

como referencia en su totalidad. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

5 El término "recombinante" en el contexto de la presente invención significa "hecho mediante ingeniería genética". Preferiblemente, un "objeto recombinante" tal como una célula recombinante en el contexto de la presente invención no es natural.

El término "natural" como se usa en el presente documento se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es natural.

10 El término "antígeno" se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se dirige y/o se genera una respuesta inmune. Preferiblemente, un antígeno en el contexto de la presente invención es una molécula que, opcionalmente después del procesamiento, induce una reacción inmune, que es preferiblemente específica para el antígeno. El término "antígeno" incluye en particular proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, especialmente ARN y ADN y nucleótidos.

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

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

30 En una realización preferida, un antígeno es un antígeno asociado a tumor, tal como CLDN 18.2, es decir, un constituyente de células cancerosas que pueden derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, intracelulares o como antígenos de superficie en células cancerosas.

35 En el contexto de la presente invención, los términos "antígeno asociado a tumor" o "antígeno tumoral" se refieren a proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas, por ejemplo, el antígeno asociado al tumor puede estar en condiciones normales expresadas específicamente en el tejido del estómago, preferiblemente en la mucosa gástrica, en los órganos reproductores, por ejemplo, en los testículos, en el tejido trofoblástico, por ejemplo, en la placenta o en las células de la línea germinal, y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. En este contexto, "un número limitado" significa preferiblemente no más de 3, más preferiblemente no más de 2. Los antígenos asociados a tumores en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, antígenos de diferenciación, preferiblemente antígenos de diferenciación específicos de tipo celular, es decir, proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un determinado tipo de célula en una determinada etapa de diferenciación, antígenos de cáncer/testículo, es decir, proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en testículo y, a veces, en placenta y antígenos específicos de la línea germinal. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia preferiblemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferiblemente no se expresa, o solo rara vez, en tejidos normales. Preferiblemente, el antígeno asociado a tumor o la expresión aberrante del antígeno asociado a tumor identifica células cancerosas. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado al tumor que es expresado por una célula cancerosa en un sujeto, por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad cancerosa es preferiblemente una proteína propia en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el antígeno asociado a tumor en el contexto de la presente invención se expresa en condiciones normales específicamente en un tejido u órgano que no es esencial, es decir, tejidos u órganos que cuando son dañados por el sistema inmune no conducen a la muerte del sujeto, o en órganos o estructuras del cuerpo a los que el sistema inmunitario no tiene acceso o apenas es accesible. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del antígeno asociado a tumor es idéntica entre el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos normales y el antígeno asociado a tumor que se expresa en tejidos cancerosos.

55 Ejemplos de antígenos de diferenciación que idealmente cumplen los criterios para antígenos asociados a tumores como estructuras objetivo en la inmunoterapia tumoral, en particular, en la vacunación tumoral son las proteínas de la superficie celular de la familia claudina, tal como CLDN18.2. Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, 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 transmembrana que atraviesan la membrana 4 veces con el extremo terminal N y el extremo C ubicados ambos en el citoplasma.

5 El término "claudina 18" o "CLDN18" se refiere preferiblemente a CLDN18 humana e incluye cualquier variante de empalme tal como CLDN18.1 y CLDN18.2 de CLDN18. CLDN18.1 y CLDN18.2 difieren en la porción del terminal N que comprende la primera región transmembrana (TM) y el bucle1, mientras que la secuencia de proteína primaria del terminal C es idéntica.

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

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

15 El término "variante" de acuerdo con la invención se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellas que están naturalmente presentes. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada.

20 Los términos "CLDN", "CLDN18", "CLDN18.1" y "CLDN18.2" abarcarán todas las variantes modificadas postraduccionalmente y las variantes de conformación.

25 CLDN18.2 se expresa selectivamente en tejidos normales en células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica. CLDN18.2 se expresa en cánceres de diversos orígenes, y es particularmente adecuada como estructura objetivo para el desarrollo de inmunoterapia contra el cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal de toxicidad relevante) y localización en la membrana plasmática. Por ejemplo, se ha encontrado que CLDN18.2 se expresa en carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y tumores ENT. CLDN18.2 es un objetivo valioso para la prevención y/o el tratamiento de tumores primarios, tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de hígado cáncer de cabeza y cuello y cánceres de vesícula biliar, y metástasis de los mismos, en particular metástasis de cáncer gástrico  
30 tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneales y metástasis de ganglios linfáticos. Las células que expresan CLDN18.2 son preferiblemente células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerígenas gástricas tumorigénicas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y vesícula biliar.

35 De acuerdo con la invención, una célula que expresa CLDN18.2 se caracteriza preferiblemente por CLDN18.2 unida a la membrana de la superficie celular, es decir, CLDN18.2 está asociada con la superficie celular. Además, de acuerdo con la invención, CLDN18.2 celular es preferiblemente CLDN18.2 unida a la membrana de la superficie celular. Una célula que expresa CLDN18.2 o una célula caracterizada por la asociación de CLDN18.2 con su superficie celular es preferiblemente una célula cancerosa, preferiblemente una célula cancerosa de un cáncer descrito en el presente documento.

40 El término "asociado con la superficie celular" significa que un antígeno asociado a tumor tal como CLDN18.2 está asociado y ubicado en la membrana plasmática de una célula, en la que al menos una parte del antígeno asociado al tumor se enfrenta al espacio extracelular de dicha célula y es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por anticuerpos ubicados fuera de la célula. En este contexto, una parte es preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 8, preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos. La asociación puede ser directa  
45 o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser por uno o más dominios transmembrana, uno o más anclajes lipídicos, o por la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que se pueda encontrar en la cúspide externa de la membrana plasmática de un célula. Por ejemplo, un antígeno asociado a tumor asociado con la superficie de una célula puede ser una proteína transmembrana que tiene una porción extracelular o puede ser una proteína asociada con la superficie de una célula al interactuar con otra proteína que es una proteína transmembrana.

50 La "superficie celular" o "superficie de una célula" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que es accesible para la unión por proteínas y otras moléculas.

55 De acuerdo con la invención, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula y no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y asociación excede el nivel de expresión y asociación en tejido no canceroso distinto del estómago por no más de 2 veces, preferiblemente 1,5 veces, y preferiblemente no excede el nivel de expresión y asociación en dicho tejido no canceroso. Preferiblemente, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula y no se asocia sustancialmente 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 por anticuerpos específicos de CLDN18.2 agregados a las células.

De acuerdo con la invención, CLDN18.2 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 tejido no canceroso distinto del estómago, preferiblemente en más de 2 veces, preferiblemente 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces. Preferiblemente, CLDN18.2 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 lo suficientemente alto como para permitir la unión mediante anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a las células.

El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, e incluye cualquier molécula que comprenda una porción de unión a antígeno de la misma. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de anticuerpos, que incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de scFv y de unión a antígeno tales como fragmentos Fab y Fab' y también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariontes, anticuerpos no glicosilados y cualquiera de los fragmentos y derivados de anticuerpo de unión a antígeno como se describe en este documento. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además 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 está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

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

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados 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.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera es homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra. Típicamente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una ventaja clara de tales formas quiméricas es que la región variable se puede derivar convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas. Si bien la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la fuente no afecta la especificidad, la región constante es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que serían la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, 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 solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite formarse como una cadena sencilla de proteínas en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar

moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar incluidos en el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Otro ejemplo son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado con un polipéptido de la región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina del dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se seleccionan por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

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

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

El término "transfectoma", como se usa en el presente documento, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, incluidas células de levadura.

Como se usa en el presente documento, 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 ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en el organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se usa en este documento, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligera y pesada con origen en diferentes organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

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

Los anticuerpos descritos en el presente documento se aíslan preferiblemente. Un "anticuerpo aislado" como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

De acuerdo con la presente invención, 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. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  M o inferior,  $10^{-6}$  M o inferior,  $10^{-7}$  M o inferior,  $10^{-8}$  M o inferior,  $10^{-9}$  M o inferior,  $10^{-10}$  M o inferior,  $10^{-11}$  M o inferior o  $10^{-12}$  M o inferior.

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

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

La unión de un anticuerpo a un objetivo puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" en *Fundamental Immunology*, Paul, WE, Ed., Raven Press New York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, WH Freeman and Company New York, NY (1992), y los métodos descritos en esos documentos. Las afinidades pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, tales como diálisis de equilibrio; utilizando el instrumento BIAcore 2000, utilizando los procedimientos generales descritos por el fabricante; por radioinmunoensayo utilizando antígeno objetivo radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., *Ann NY Acad. Sci.*, 51: 660 (1949). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo,  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por genes de región constante de cadena pesada. Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen anticuerpos IgG2a (por ejemplo, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG2b (por ejemplo, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG3 (por ejemplo, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) y anticuerpos IgM. Sin embargo, otros isotipos de anticuerpos también están abarcados por la invención, incluidos los anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE.

Como se usa en este documento, "cambio 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 "reordenado" como se usa en el presente documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en la que un segmento V se coloca inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Se puede identificar un locus del gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado en comparación con el ADN de línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

El término "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para ser inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

De acuerdo con la invención, los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen pero no se limitan a ratón, rata, conejo, cobaya y humano. Los anticuerpos también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferiblemente humana, se combina con el sitio de unión al antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con regiones constantes y marco de origen humano.

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

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 técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

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

En aún otra realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLDN18.2 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en dichos ratones transgénicos se puede realizar como se describe en detalle para CD20 en el documento WO2004 035607.

Otra estrategia más para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de especificidad definida; véanse, por ejemplo, Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Para más detalles sobre ingeniería de anticuerpos recombinantes, véase también Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN- 0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Para generar anticuerpos para CLDN18.2, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con portador derivados de la secuencia de CLDN18.2, una preparación enriquecida de antígeno de CLDN18.2 expresado de forma recombinante o sus fragmentos y/o células que expresan CLDN18.2 o fragmentos de los mismos, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica CLDN18.2 humana de longitud completa o fragmentos del mismo. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno de CLDN18.2 no den como resultado anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CLDN18.2, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La respuesta inmune se puede controlar en el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero obtenidas por venas de la cola o sangrados retroorbitales. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-CLDN18.2 pueden usarse para fusiones. Los ratones se pueden reforzar por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan CLDN18.2 3-5 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas secretores de anticuerpos específicos.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra CLDN18.2, las células de ganglios linfáticos, bazo o médula ósea 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 seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales pueden seleccionarse luego mediante ELISA para detectar hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS usando células que expresan CLDN18.2, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para CLDN18.2. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden ser sembrados, seleccionados nuevamente, y si aún son positivos para anticuerpos monoclonales anti-CLDN18.2 pueden subclonarse mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

Los anticuerpos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como son bien conocidos en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, se pueden ligar en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el utilizado por el sistema de expresión del gen GS divulgado en los documento WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped eucariotas tales como células CHO, células NS0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método utilizado para introducir estos genes pueden ser métodos descritos en la técnica, tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que luego pueden amplificarse para su nivel de expresión y aumentar su escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados 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, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase, por ejemplo, Verma, R. et al., (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock et al., (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., et al., (1999) Biol. Chem 380: 825-839.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de los 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 lo describen Kraus et al., en Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8). En una realización preferida, los anticuerpos quiméricos se generan uniendo la región constante de cadena ligera kappa humana a la región variable de cadena ligera murina. En una realización también preferida, Los anticuerpos quiméricos se pueden generar uniendo la región constante de cadena ligera lambda humana a la región variable de

cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes preferidas de cadena pesada para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

5 Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico  
10 injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., (1986) Nature 321: 522-525; y Queen, C. et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias del gen de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en posiciones individuales de manera uniforme en la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción del terminal amino de la región marco 1 y en la porción del terminal carboxilo de la región marco 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 (véase el documento 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 variable de línea germinal y qué segmentos de genes de unión contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de línea germinal se usa para completar las partes 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 agregar secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligadura o amplificación por PCR. Alternativamente, toda la región variable se puede sintetizar como un conjunto de oligonucleótidos cortos y superpuestos y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas, tales como la eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se pueden usar para diseñar un conjunto superpuesto de oligonucleótidos sintéticos 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: las 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  
35 secuencia arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Tanto para las regiones variables de cadena pesada como ligera, la codificación optimizada y las secuencias de cadena no codificantes correspondientes se dividen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos de doble cadena superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Los grupos se usan luego como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se dividirá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR superpuestos. Estos productos superpuestos se combinan luego mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento de superposición de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en los constructos del vector de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan luego con el promotor clonado, el líder, el inicio de la traducción, la región constante, las secuencias 3' no traducidas, la poliadenilación y la terminación de la transcripción para formar constructos de vectores de expresión. Los constructos de expresión de la cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que luego se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas. Se describen plásmidos para uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana. Los plásmidos pueden construirse de modo que las secuencias de ADNc de cadena pesada V y cadena ligera V kappa amplificadas por PCR puedan usarse para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos se pueden usar para expresar completamente anticuerpos humanos o IgG1 quimérico, Kappa o IgG4. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

60 Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de los anticuerpos anti-CLDN18.2 descritos en este documento, se usan para crear anticuerpos anti-CLDN18.2 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a CLDN18.2. Más

específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-CLDN18.2 humanizados adicionales, modificados de manera recombinante.

5 La capacidad de un anticuerpo para unirse a CLDN18.2 se puede determinar usando ensayos de unión estándar, por ejemplo, ELISA, transferencia Western, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo. ELISA puede usarse para demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a proteínas o péptidos CLDN18.2. Los péptidos o proteínas utilizados para la inmunización pueden usarse para determinar la especificidad de los sobrenadantes de hibridoma o analizar títulos de suero.

10 Para demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas, se puede usar citometría de flujo. Las líneas celulares que se expresan de forma natural o después de la transfección de antígeno y controles negativos que carecen de expresión de antígeno (crecido en condiciones de crecimiento estándar) se pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contienen FBS al 1%, y se pueden incubar a 4 °C durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido al antígeno en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar por citometría de flujo con un instrumento FACS utilizando propiedades de dispersión lateral y de luz para bloquear las células vivas individuales. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de los ligandos no específicos en una sola medición, se puede emplear el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican el antígeno y un marcador fluorescente pueden teñirse como se describió anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpos. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno se unen preferentemente a las células que expresan marcadores de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia además del ensayo de citometría de flujo o en lugar del mismo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

15 Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLDN18.2 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLDN18.2, se puede usar el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que se expresan espontáneamente o después de la transfección CLDN18.2 y los controles negativos que carecen de expresión de CLDN18.2 se cultivan en portaobjetos en cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células pueden fijarse luego con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Las células pueden reaccionar con anticuerpos monoclonales contra CLDN18.2 durante 30 minutos a 25 °C. Después del lavado, 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 ser examinadas por microscopía de fluorescencia.

20 Los niveles totales de CLDN18.2 en células pueden observarse cuando las células se fijan con metanol o se fijan paraformaldehído y se permeabilizan con Triton X-100. En células vivas y no permeabilizadas, se puede examinar la localización superficial de CLDN18.2 en células fijadas con paraformaldehído. Además, el direccionamiento de CLDN18.2 a uniones estrechas se puede analizar mediante tinción conjunta con marcadores de unión estrecha como ZO-1. Además, se pueden examinar los efectos de la unión de anticuerpos y la localización de CLDN18.2 dentro de la membrana celular.

25 La IgG anti-CLDN18.2 puede analizarse adicionalmente para determinar la reactividad con el antígeno CLDN18.2 mediante transferencia Western. Brevemente, los extractos celulares de las células que expresan CLDN18.2 y los controles negativos apropiados se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a las membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se explorarán con los anticuerpos monoclonales que se van a analizar. La unión a IgG se puede detectar usando peroxidasa anti-IgG de ratón y se puede desarrollar con sustrato ECL.

30 Las IgG anti-CLDN18.2 de ratón se pueden analizar por la reactividad con antígeno CLDN18.2 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, usando criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído de muestras de tejido no canceroso o tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos de rutina o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que se expresan espontáneamente o después de la transfección con CLDN18.2. Para la inmunotinción, los anticuerpos reactivos a CLDN18.2 pueden incubarse seguidos de anticuerpos anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

35 Una metodología particularmente preferida para analizar CLDN18.2 en los métodos de la invención es inmunohistoquímica o IHC. La inmunohistoquímica o IHC se refiere al proceso de detección de antígenos (por ejemplo, proteínas) en células de una sección de tejido, por ejemplo, células de los tejidos mencionados en el presente documento. La tinción inmunohistoquímica se usa ampliamente en el diagnóstico de células anormales como las que se encuentran en los tumores cancerosos. La visualización de una interacción anticuerpo-antígeno se puede lograr de varias

maneras. En el caso más común, un anticuerpo se conjuga con una enzima, tal como la peroxidasa, que puede catalizar una reacción productora de color. Alternativamente, el anticuerpo también puede marcarse con un fluoróforo, tal como fluoresceína o rodamina.

5 La preparación de la muestra es crítica para mantener la morfología celular, la arquitectura del tejido y la antigenicidad de los epítomos objetivo. Esto requiere una adecuada recolección de tejido, fijación y seccionamiento. El paraformaldehído generalmente se usa con fijación. Dependiendo del propósito y el grosor de la muestra experimental, se cortan secciones delgadas (aproximadamente 4-40  $\mu\text{m}$ ) del tejido de interés, o si el tejido no es muy grueso y es penetrable, se usa entero. El corte generalmente se logra mediante el uso de un micrótopo, y las rodajas se montan en portaobjetos.

10 La muestra puede requerir etapas adicionales para hacer que los epítomos estén disponibles para la unión a anticuerpos, incluyendo la desparafinación y la recuperación de antígeno. Los detergentes como Triton X-100 generalmente se usan en inmunohistoquímica para reducir la tensión superficial, permitiendo que se use menos reactivo para lograr una cobertura mejor y más uniforme de la muestra.

15 El método directo de tinción inmunohistoquímica utiliza un anticuerpo marcado, que se une directamente al antígeno que se tiñe. El método indirecto de tinción inmunohistoquímica, que es más común, utiliza un anticuerpo contra el antígeno que se prueba y un segundo anticuerpo marcado contra el primero.

20 Para reducir la tinción de fondo en IHC, las muestras se incuban con un tampón que bloquea los sitios reactivos a los que los anticuerpos primarios o secundarios pueden unirse. Los anticuerpos primarios se generan contra un antígeno de interés y típicamente no se conjugan (no se marcan), mientras que los anticuerpos secundarios se generan contra las inmunoglobulinas de la especie de anticuerpo primario. El anticuerpo secundario generalmente se conjuga con una molécula enlazadora, tal como biotina, que luego recluta moléculas indicadoras, o el anticuerpo secundario se une directamente a la propia molécula informadora. Los tampones de bloqueo comunes incluyen suero normal, leche en polvo sin grasa, BSA o gelatina y tampones de bloqueo comerciales.

25 Las moléculas informadoras varían en función de la naturaleza del método de detección, y los métodos de detección más populares son con detección cromogénica y fluorescente mediada por enzimas y fluoróforos, respectivamente. Con los informadores cromogénicos, se hace reaccionar un marcador enzimático con un sustrato para producir un producto de color intenso que se puede analizar con un microscopio óptico ordinario. Si bien la lista de sustratos enzimáticos es extensa, la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP) son las dos enzimas más utilizadas como marcadores para la detección de proteínas. Se encuentra disponible una variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes para usar con cualquier enzima, incluyendo DAB o BCIP/NBT. Los informadores fluorescentes son pequeñas moléculas orgánicas utilizadas para la detección de IHC. Para los métodos de detección cromogénica y fluorescente, el análisis densitométrico de la señal puede proporcionar datos semicuantitativos y completamente cuantitativos, respectivamente para correlacionar el nivel de señal informadora con el niveles de expresión o ubicación de la proteína.

35 Después de la tinción inmunohistoquímica del antígeno objetivo, a menudo se aplica una segunda tinción para proporcionar contraste que ayuda a que se destaque la tinción primaria. Muchas de estas tinciones muestran especificidad por compartimentos celulares discretos o antígenos, mientras que otras teñirán la célula completa. Los colorantes cromogénicos y fluorescentes están disponibles para IHC para proporcionar una amplia gama de reactivos para adaptarse a cada diseño experimental. La hematoxilina, la tinción de Hoechst y DAPI se usan comúnmente.

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

45 El término "funciones efectoras inmunes" en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmunitario que da como resultado la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, incluida la inhibición de la diseminación y la metástasis tumoral. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunes dan como resultado la muerte de células cancerosas. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunes en el contexto de la presente invención son funciones efectoras mediadas por anticuerpos. Dichas funciones comprenden citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP), inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado al tumor, por ejemplo, mediante unión del anticuerpo a un antígeno de superficie, inhibición de la transducción de señal mediada por CD40L, por ejemplo, mediante la unión del anticuerpo al receptor CD40 o al ligando CD40 (CD40L), y/o la inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado al tumor, preferiblemente ADCC y/o CDC. Por lo tanto, los anticuerpos que son capaces de mediar una o más funciones efectoras inmunes son preferiblemente capaces de mediar la destrucción de células induciendo lisis mediada por CDC, lisis mediada por ADCC, apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente mediante la inducción de lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Los anticuerpos también pueden ejercer un efecto simplemente mediante la unión a antígenos asociados a tumores en la superficie de una célula cancerosa. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado al tumor o inducir apoptosis simplemente mediante la unión al antígeno asociado al tumor en la superficie de una célula cancerosa.

ADCC describe la capacidad de las células efectoras de matar células, en particular de los linfocitos, que preferiblemente requiere que la célula objetivo esté marcada por un anticuerpo. La ADCC ocurre preferiblemente cuando los anticuerpos se unen a los antígenos en las células cancerosas y los dominios Fc del anticuerpo se unen a los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunes. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores de Fc definidos. ADCC puede verse como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que también conduce a la presentación de antígenos y a la inducción de respuestas de células T dirigidas a tumores. Preferiblemente, la inducción *in vivo* de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas a tumores y a respuestas adicionales de anticuerpos derivados del huésped.

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 también son muy eficaces para dirigir los CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo da como resultado el desbloqueo de múltiples sitios de unión de C1q en las proximidades de los dominios C<sub>H</sub>2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente, estos sitios de unión de C1q sin recubrimiento convierten la interacción de C1q-IgG previamente de baja afinidad en una de alta afinidad, que desencadena una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque de membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula y puede conducir a la apoptosis.

El término "células efectoras inmunes" en el contexto de la presente invención se refiere a células que ejercen funciones efectoras durante una reacción inmune. Por ejemplo, tales células secretan citocinas y/o quimiocinas, matan microbios, secretan anticuerpos, reconocen células cancerosas y opcionalmente eliminan tales células. Por ejemplo, las células efectoras inmunes comprenden células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T infiltrantes de tumores), células B, células asesinas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas.

De acuerdo con la invención, un ácido nucleico es preferiblemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), más preferiblemente ARN, lo más preferiblemente ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT). Los ácidos nucleicos incluyen de acuerdo con la invención ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas recombinantemente preparadas y sintetizadas químicamente. De acuerdo con la invención, un ácido nucleico puede estar en forma de una molécula que es monocatenaria o bicatenaria y lineal o cerrada covalentemente para formar un círculo. Se puede emplear un ácido nucleico para la introducción en, es decir, la transfección de células, por ejemplo, en forma de ARN que se puede preparar por transcripción *in vitro* a partir de una plantilla de ADN. Además, el ARN puede modificarse antes de la aplicación mediante la estabilización, protección y poliadenilación de las secuencias.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden estar comprendidos en un vector. El término "vector" tal como se usa en el presente documento incluye cualquier vector conocido por la persona experta, incluidos vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores fagos tales como fagos lambda, vectores virales tales como vectores adenovirales o baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión así como de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y generalmente contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de codificación operativamente unida en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se usan generalmente para modificar y amplificar un cierto fragmento deseado de ADN y pueden carecer de secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos deseados de ADN.

Como el vector para la expresión de un anticuerpo, puede usarse un tipo de vector en el que las cadenas de anticuerpos están presentes en diferentes vectores o un tipo de vector en el que las cadenas de anticuerpos están presentes en el mismo vector.

Como se usa en este documento, el término "ARN" significa una molécula que comprende al menos un residuo de ribonucleótido. Por "ribonucleótido" se entiende un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de una fracción beta-D-ribofuranosa. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido en forma recombinante, así como ARN alterado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al o los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN natural.

De acuerdo con la presente invención, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito" que puede producirse usando ADN como molde y codifica un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región 5' no traducida, una región codificante de proteínas o péptidos y una región 3' no traducida. El ARNm tiene un semivida limitada en las células e *in vitro*.

En el contexto de la presente invención, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN.

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

Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la invención, estar presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico está funcionalmente unido a secuencias de control de expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. El término "homólogo" significa que los ácidos nucleicos también están funcionalmente unidos naturalmente y el término "heterólogo" significa que los ácidos nucleicos no están naturalmente funcionalmente unidos.

Un ácido nucleico y una secuencia de control de expresión están "funcionalmente" unidos entre sí, si están covalentemente unidos entre sí de tal manera que la expresión o transcripción de dicho ácido nucleico esté bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. Si el ácido nucleico se va a traducir en una proteína funcional, entonces, con una secuencia de control de expresión funcionalmente unida a una secuencia de codificación, la inducción de dicha secuencia de control de expresión da como resultado la transcripción de dicho ácido nucleico, sin causar un cambio de marco en la secuencia de codificación o dicha secuencia de codificación no es capaz de traducirse en la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia de control de expresión" o "elemento de control de expresión" comprende de acuerdo con la invención promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares de la invención, las secuencias de control de expresión pueden regularse. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar en función de la especie o el tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como la Caja TATA, secuencia de protección; secuencia de CAAT y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión no transcritas 5' comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras secuencia arriba.

De acuerdo con la invención, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se encuentra secuencia arriba (5') a la secuencia de ácido nucleico que se expresa y controla la expresión de la secuencia proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para factores adicionales que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procarionota o eucariota. 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 solo se expresa en pequeña medida si no hay un agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se activa o aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

Los promotores que se prefieren de acuerdo con la invención incluyen promotores para polimerasa SP6, T3 y T7, promotor de ARN U6 humano, promotor CMV y promotores híbridos artificiales de los mismos (por ejemplo, CMV) en los que una parte o partes se fusionan a una parte o partes de promotores de genes de otras proteínas celulares tales como, por ejemplo, GAPDH humana (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), y que incluye o no incluye un intrón o intrones adicionales.

El término "expresión" se usa en el presente documento en su significado más amplio y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína o péptido. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o puede ser estable. De acuerdo con la invención, el término expresión también incluye una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

"Expresión aberrante" o "expresión anormal" significa de acuerdo con la invención que la expresión está alterada, preferiblemente aumentada, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un sujeto que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una determinada proteína, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor. 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%, o más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

El término "expresado específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica y no se expresa en otros tejidos o no se expresa de manera significativa en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y, en menor medida, en cualquier otro tejido se expresa específicamente en las células de

la mucosa gástrica. En algunas realizaciones, un antígeno asociado a tumor también puede expresarse específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejido u órganos, pero preferiblemente en no más de 3 tipos diferentes de tejido u órgano. En este caso, el antígeno asociado a tumor se expresa entonces específicamente en estos órganos.

5 El término "traducción" de acuerdo con la invención se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar una proteína o péptido.

De acuerdo con la invención, el término "codificación de ácido nucleico" significa que el ácido nucleico, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

10 El término "péptido" comprende oligopéptidos y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferiblemente 3 o más, preferiblemente 4 o más, preferiblemente 6 o más, preferiblemente 8 o más, preferiblemente 9 o más, preferiblemente 10 o más, preferiblemente 13 o más, preferiblemente 16 más, preferiblemente 21 o más y preferiblemente hasta 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferiblemente a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento.

15 Preferiblemente, las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la invención han sido aislados. Los términos "proteína aislada" o "péptido aislado" significan que la proteína o péptido se ha separado de su entorno natural. Una proteína o péptido aislado puede estar en un estado esencialmente purificado. El término "esencialmente purificado" significa que la proteína o péptido está esencialmente libre de otras sustancias con las que está asociada en la naturaleza o *in vivo*.

20 La enseñanza dada en el presente documento con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, las que se muestran en la lista de secuencias, debe interpretarse de manera que también se relacione con modificaciones, es decir, variantes, de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo. Preferiblemente, 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.

25 Los expertos en la materia apreciarán que, en particular, las secuencias de las secuencias de CDR, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a un objetivo. Por ejemplo, las secuencias de CDR serán idénticas o altamente homólogas a las secuencias de CDR especificadas en el presente documento.

30 Por "altamente homólogo" se contempla que se puedan hacer de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones.

35 El término "variante" de acuerdo con la invención también incluye mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que están naturalmente presentes. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación genética completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada.

40 Para los fines de la presente invención, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de eliminación de aminoácidos que comprenden la eliminación en el extremo terminal N y/o el extremo Terminal C de la proteína también se denominan variantes de truncamiento del terminal N y/o del terminal C.

45 Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos 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 particular en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción aleatoria con el cribado apropiado del producto resultante.

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

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

55 Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por que al menos un residuo en la secuencia se elimina y otro residuo se inserta en su lugar. Se da preferencia a las modificaciones que se encuentran en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos

con otros que tienen propiedades similares. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteínas son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga similar o sin carga. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos naturales generalmente se dividen en cuatro familias: ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano y la tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consta de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por 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, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia se puede hacer con herramientas conocidas en la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS :: aguja, Matriz: Blosum62, Apertura de hueco 10.0, extensión de hueco 0,5.

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

El término "identidad porcentual" pretende denotar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenidas después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias que se distribuyen al azar y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado 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 se puede producir, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin).

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

Las secuencias de aminoácidos homólogas exhiben de acuerdo con la invención al menos 40%, en particular al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% y preferiblemente al menos 95%, al menos 98 o al menos 99% de identidad de los residuos de aminoácidos.

Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento pueden prepararse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar proteínas y péptidos que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o eliminaciones, se describe en detalle en Sambrook et al. (1989), por ejemplo. Además, los péptidos y las variantes de aminoácidos descritos en el presente documento pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas conocidas de síntesis de péptidos tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares.

La invención incluye derivados de los péptidos o proteínas descritos en el presente documento que están comprendidos por los términos "péptido" y "proteína". De acuerdo con la invención, "derivados" de proteínas y péptidos son formas modificadas de proteínas y péptidos. Dichas modificaciones incluyen cualquier modificación química y comprenden sustituciones, eliminaciones y/o adiciones simples o múltiples de cualquier molécula asociada con la proteína o péptido, tales como carbohidratos, lípidos y/o proteínas o péptidos. En una realización, "derivados" de proteínas o péptidos incluyen aquellos análogos modificados que resultan de la glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivación, introducción de grupos protectores/bloqueadores, escisión proteolítica o unión a un anticuerpo u otro ligando celular. El término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos. Preferiblemente, un péptido modificado tiene mayor estabilidad y/o mayor inmunogenicidad.

De acuerdo con la invención, una variante, derivado, forma modificada, fragmento, parte o porción de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína tiene preferiblemente una propiedad funcional de la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la que se ha derivado, es decir, es funcionalmente equivalente. En una realización, una variante, derivado, forma modificada, fragmento, parte o porción de una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína es inmunológicamente equivalente a la secuencia de aminoácidos, péptido o proteína, respectivamente, de la que se ha derivado. En una realización, la propiedad funcional es una propiedad inmunológica.

El término "derivado" significa de acuerdo con la invención que una entidad particular, en particular una secuencia particular, está presente en el objeto del que se deriva, en particular un organismo o molécula. En el caso de secuencias de aminoácidos, especialmente regiones de secuencias particulares, "derivado" en particular significa que la secuencia de aminoácidos relevante se deriva de una secuencia de aminoácidos en la que está presente.

El término "célula" o "célula huésped" es preferiblemente 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 es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. 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). Las células de mamífero son particularmente preferidas, como las células de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejidos e incluyen células primarias y líneas celulares. El término "célula" incluye células no cancerosas y células cancerosas tal como células de los tipos de cáncer divulgados en el presente documento.

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

"Célula objetivo" significa una célula que es un objetivo para una respuesta inmune tal como un anticuerpo. Las células objetivo incluyen cualquier célula indeseable tal como una célula cancerosa como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas, la célula objetivo es una célula que expresa CLDN18.2. Las células que expresan CLDN18.2 típicamente incluyen células cancerosas.

El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera de anticuerpo, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos humanos anti-CLDN18.2 cuando se inmuniza con antígeno CLDN18.2 y/o células que expresan CLDN18.2. 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, tal como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de los ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CLDN18.2 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando recombinación VDJ y cambio de isotipo.

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, como la inducción de una reacción inmune humoral, la fuerza y/o duración de la reacción inmune inducida, o la especificidad de la reacción inmune. En el contexto de la presente invención, el término "inmunológicamente equivalente" se usa preferiblemente con respecto a los efectos inmunológicos o propiedades de un péptido o variante de péptido usada para inmunización o un anticuerpo. Una propiedad inmunológica particular es la capacidad de unirse a anticuerpos y, cuando sea apropiado, generar una respuesta inmune, preferiblemente estimulando 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, preferiblemente 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 CLDN18.2.

La invención proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CLDN18.2 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CLDN18.2, que comprende poner en contacto la muestra, y opcionalmente una muestra de control, con un anticuerpo de la invención que se une a CLDN18.2, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y CLDN18.2. Entonces se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia en la formación de complejo entre la muestra en comparación con una muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno CLDN18.2 en la muestra.

Los métodos descritos anteriormente son útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con CLDN18.2 tales como enfermedades cancerosas. Preferiblemente, una cantidad de CLDN18.2 en una muestra que es mayor que la cantidad de CLDN18.2 en una muestra de referencia o control es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con CLDN18.2 en un sujeto, en particular un humano, del cual se deriva la muestra.

5 Cuando se usa en los métodos descritos anteriormente, un anticuerpo descrito en el presente documento puede proporcionarse con un marcador que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o segundo marcador, por ejemplo FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia); (iii) afecta la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, por carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporciona una fracción de captura, por ejemplo, afinidad, anticuerpo/antígeno o complejación iónica. Adecuados como marcadores están estructuras, tales como marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferiblemente marcadores isotópicos estables, marcadores isobáricos, marcadores enzimáticos, marcadores de partículas, en particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lectinas, secuencias marcadoras que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes de unión, etc. Los marcadores comprenden, en una forma no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y diagnóstico con radio, incluidos los emisores de positrones tales como flúor 18 y carbono 11, los emisores gamma tales como yodo 123, tecnecio 99m, yodo 131 e indio 111, nucleídos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

10 De acuerdo con la invención, una "referencia" tal como una muestra de referencia u organismo de referencia puede usarse para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de la invención a partir de una muestra de prueba u organismo de prueba. Típicamente, el organismo de referencia es un organismo sano, en particular un organismo que no padece una enfermedad tal como una enfermedad cancerosa. Se puede determinar un "valor de referencia" o "nivel de referencia" a partir de una referencia empíricamente midiendo un número suficientemente grande de referencias. Preferiblemente, el valor de referencia se determina midiendo al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 8, preferiblemente al menos 12, preferiblemente al menos 20, preferiblemente al menos 30, preferiblemente al menos 50, o preferiblemente al menos 100 referencias.

20 "Reducir" o "inhibir" como se usa en el presente documento significa la capacidad de causar una disminución general, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y lo más preferiblemente de 75% o más, en el nivel. El término "inhibir" o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

30 Los términos tales como "aumentar" o "mejorar" se refieren preferiblemente a un aumento o mejora en aproximadamente al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 100%.

35 Los agentes, composiciones y métodos descritos en este documento pueden usarse para diagnosticar un sujeto con una enfermedad. Las enfermedades que pueden diagnosticarse abarcan todas las enfermedades que expresan CLDN18.2. Las enfermedades particularmente preferidas son enfermedades cancerosas tales como las enfermedades cancerosas descritas en el presente documento.

De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo enfermedades cancerosas, en particular aquellas formas de enfermedades cancerosas descritas en el presente documento.

40 El término "normal" tal como se usa en los términos "tejido normal" o "condiciones normales" se refiere a tejido sano o las condiciones en un sujeto sano, es decir, condiciones no patológicas, en las que "sano" significa preferiblemente no canceroso.

45 "Enfermedad que implica células que expresan CLDN18.2" significa de acuerdo con la invención que la expresión de CLDN18.2 en células de un tejido u órgano enfermo se incrementa preferiblemente 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 10.000% o incluso más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades que implican o están asociadas con células que expresan CLDN18.2 incluyen enfermedades cancerosas, en particular aquellas formas de cáncer descritas en el presente documento.

50 De acuerdo con la invención, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" se refiere a una hinchazón o lesión formada por un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas o células tumorales). Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa de tejido distinta, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

55 Un tumor benigno es un tumor que carece de las tres propiedades malignas de un cáncer. Por lo tanto, por definición, un tumor benigno no crece de manera ilimitada y agresiva, no invade los tejidos circundantes y no se propaga a los tejidos no adyacentes (metástasis). Los ejemplos comunes de tumores benignos incluyen lunares y fibromas uterinos.

El término "benigno" implica una enfermedad leve y no progresiva, y de hecho, muchos tipos de tumores benignos son inofensivos para la salud. Sin embargo, algunas neoplasias que se definen como "tumores benignos" porque carecen de

las propiedades invasivas de un cáncer, aún pueden producir efectos negativos para la salud. Ejemplos de esto incluyen tumores que producen un "efecto de masa" (compresión de órganos vitales como los vasos sanguíneos) o tumores "funcionales" de tejidos endocrinos, que pueden producir en exceso ciertas hormonas (los ejemplos incluyen adenomas tiroideos, adenomas adrenocorticales y adenomas pituitarios).

5 Los tumores benignos típicamente están rodeados por una superficie externa que inhibe su capacidad de comportarse de manera maligna. En algunos casos, ciertos tumores "benignos" pueden dar lugar a cánceres malignos, que resultan de cambios genéticos adicionales en una subpoblación de las células neoplásicas del tumor. Un ejemplo destacado de este fenómeno es el adenoma tubular, un tipo común de pólipo de colon que es un precursor importante del cáncer de colon. Las células en los adenomas tubulares, como la mayoría de los tumores que frecuentemente evolucionan a cáncer, muestran ciertas anomalías en la maduración y apariencia celular conocidas colectivamente como displasia. Estas anomalías celulares no se observan en tumores benignos que rara vez o nunca se vuelven cancerosos, pero se observan en otras anomalías de tejido precanceroso que no forman masas discretas, tales como lesiones precancerosas del cuello uterino. Algunas autoridades prefieren referirse a los tumores displásicos como "pre malignos" y reservan el término "benigno" para los tumores que rara vez o nunca dan lugar al cáncer. Un neoplasma es una masa anormal de tejido como resultado de una neoplasia. Neoplasia (nuevo crecimiento en griego) es la proliferación anormal de células. El crecimiento de las células excede, y no está coordinado con el de los tejidos normales a su alrededor. El crecimiento persiste de la misma manera excesiva incluso después del cese de los estímulos. Generalmente causa un bulto o tumor. Las neoplasias pueden ser benignas, pre malignas o malignas.

20 "Crecimiento de un tumor" o "crecimiento tumoral" de acuerdo con la invención se refiere a la tendencia de un tumor a aumentar su tamaño y/o a la tendencia de las células tumorales a proliferar.

25 Cáncer (término médico: neoplasia maligna) es una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestra un crecimiento incontrolado (división más allá de los límites normales), invasión (intrusión en y destrucción de tejidos adyacentes) y, algunas veces, metástasis (propagación a otras ubicaciones en el cuerpo a través de la linfa o la sangre). Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos, que son autolimitados y no invaden ni hacen metástasis. La mayoría de los cánceres forman un tumor, pero algunos, como la leucemia, no. De acuerdo con la invención, los términos "cáncer" y "tumor" o "enfermedad cancerosa" y "enfermedad tumoral" generalmente se usan indistintamente en el presente documento para referirse a enfermedades en las que las células muestran un crecimiento incontrolado y opcionalmente invasión y/o metástasis.

30 Preferiblemente, una "enfermedad cancerosa" de acuerdo con la invención se caracteriza por células que expresan CLDN 18.2. Una célula que expresa CLDN18.2 es preferiblemente una célula cancerosa, preferiblemente de los tumores y cánceres descritos en el presente documento. Preferiblemente, dicha célula es una célula distinta de una célula del estómago.

Los cánceres se clasifican por el tipo de célula que se parece al tumor y, por lo tanto, al tejido que se supone que es el origen del tumor. Estas son la histología y la ubicación, respectivamente.

35 El término "cáncer" de acuerdo con la invención comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer endometrial, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer del cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, 40 cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y sus metástasis. Ejemplos de los mismos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas cervicales o metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de acuerdo con la invención también comprende metástasis de cáncer.

45 Los tipos principales de cáncer de pulmón son el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Existen 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. Este cáncer generalmente se ve periféricamente en los pulmones, a diferencia del cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de pulmón de células escamosas, que tienden a estar ubicados más centralmente.

50 De acuerdo con la invención, un "carcinoma" es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo representa los cánceres más comunes, incluidas las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

55 Por "metástasis" se entiende la propagación de 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 ingresar a la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportadas por la sangre, infiltración de órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor, es decir, un tumor secundario o tumor metastásico, en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una

realización, el término "metástasis" de acuerdo la invención se refiere a "metástasis distante" que se refiere a una metástasis que es remota del tumor primario y el sistema regional de ganglios linfáticos.

5 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 está formado por células ováricas anormales, no por células hepáticas anormales. El tumor en el hígado se denomina cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

10 Una recaída o recurrencia ocurre cuando una persona se ve afectada nuevamente por una condición que la afectó en el pasado. Por ejemplo, si un paciente ha sufrido una enfermedad de cáncer, ha recibido un tratamiento exitoso de dicha enfermedad y nuevamente desarrolla dicha enfermedad, dicha enfermedad recientemente desarrollada puede considerarse una recaída o recurrencia. Sin embargo, de acuerdo con la invención, una recaída o recurrencia de una enfermedad cancerosa puede ocurrir, pero no necesariamente, en el sitio de la enfermedad cancerosa original. Así, por ejemplo, si una paciente ha sufrido un tumor ovárico y ha recibido un tratamiento exitoso, una recaída o recurrencia puede ser la aparición de un tumor ovárico o la aparición de un tumor en un sitio diferente al ovario. Una recaída o recurrencia de un tumor también incluye situaciones en las que un tumor se produce en un sitio diferente al sitio del tumor original, así como en el sitio del tumor original. Preferiblemente, el tumor original para el que el paciente ha recibido un tratamiento es un tumor primario y el tumor en un sitio diferente al sitio del tumor original es un tumor secundario o metastásico.

15 Por "tratar" se entiende administrar un compuesto o composición a un sujeto para prevenir o eliminar una enfermedad, incluida la reducción del tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o hacer más lenta una enfermedad en un sujeto; inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o severidad de los síntomas y/o recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que previamente ha tenido una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la vida útil del sujeto.

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

25 Por "estar en riesgo" se entiende un sujeto, es decir, un paciente, que se identifica que tiene una probabilidad mayor de lo normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha tenido, o que tiene actualmente, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que dicho sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen, o que han tenido, un cáncer también tienen un mayor riesgo de metástasis de cáncer.

30 El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica una reacción inmune específica. En el contexto de la presente invención, términos tales como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se relacionan con la prevención o el tratamiento o la ocurrencia y/o propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, para minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o para retrasar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una persona en riesgo de un tumor, como se describió anteriormente, sería un candidato para la terapia para prevenir un tumor. La inmunoterapia se puede realizar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas, en las cuales los agentes funcionan para eliminar las células que expresan antígeno de un paciente.

35 En ciertas realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmunitario del huésped endógeno para reaccionar contra las células enfermas con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmunitaria (tales como péptidos inmunorreactivos y ácidos nucleicos).

40 En otras realizaciones, la inmunoterapia puede ser inmunoterapia pasiva, en la que el tratamiento implica la administración de agentes con reactividad inmune tumoral establecida (como anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente los efectos antitumorales y no necesariamente depende de un sistema inmune intacto de huésped.

El término "in vivo" se refiere a la situación en un sujeto.

45 Los términos "sujeto", "individuo", "organismo" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a vertebrados, preferiblemente mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente invención son humanos, primates no humanos, animales domesticados como perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio como ratones, ratas, conejos, conejillos de indias, etc., así como animales en cautiverio, tales como animales de zoológicos. El término "animal" como se usa en el presente documento también incluye humanos. El término "sujeto" también puede incluir un paciente, es decir, un animal, preferiblemente un ser humano que tiene una enfermedad, preferiblemente una enfermedad como se describe en el presente documento.

50 De acuerdo con la invención, una "muestra" puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente invención, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, que incluye fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse en forma convencional tal como por biopsia de tejido, incluida la biopsia por punción, y tomando sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. De acuerdo con la invención, el término "muestra" también incluye muestras procesadas tales como fracciones o aislados de muestras biológicas, por ejemplo, ácidos nucleicos y aislados de péptidos/proteínas. Preferiblemente, una muestra contiene células o tejido del órgano que se va a examinar, por ejemplo, al que se le va a diagnosticar cáncer. Por ejemplo, si el cáncer a diagnosticar es cáncer de pulmón, una muestra puede contener células o tejido obtenido de pulmón.

De acuerdo con la invención, una muestra puede ser una muestra tal como una muestra corporal derivada de un paciente que contiene o se espera que contenga células tumorales o cancerosas. La muestra corporal puede ser cualquier muestra de tejido tal como sangre, una muestra de tejido obtenida del tumor primario o de metástasis tumorales o cualquier otra muestra que contenga células tumorales o cancerosas.

5 La presente invención se describe en detalle por las figuras y ejemplos a continuación.

Figuras:

Figura 1: Alineación de secuencias de proteínas claudina 18 (humanas/murinas)

La alineación de secuencia muestra la alta homología entre claudina 18.2 humana y de ratón y claudina 18.1 y claudina 18.2 humanas.

10 Figura 2: Proteína recombinante que incluye la porción del terminal C de CLDN18.2 (aa 191-261) utilizada para la inmunización de ratones

Figura 3: análisis de secuencia de anticuerpos 43-14A y 35-22A

Ejemplos

15 Las técnicas y métodos utilizados en este documento se describen en el presente documento o se llevan a cabo de una manera ya conocida y como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Todos los métodos, incluido 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: generación de anticuerpos monoclonales

20 El objetivo de este proyecto fue generar anticuerpos monoclonales murinos específicos para CLDN18 capaces de detectar células tumorales que expresan CLDN18.2 en tejidos FFPE de CA de estómago, CA de esófago, CA de páncreas y CA de pulmón.

25 Para generar un anticuerpo CLDN18.2 de diagnóstico altamente específico y de alta afinidad, fue esencial comenzar los protocolos de inmunización con una gran variación de diferentes inmunógenos y adyuvantes. Durante el proyecto, se inocularon aproximadamente 100 ratones (C57Bl/6 y Balb/c), utilizando diversas estrategias de inmunización para desencadenar una respuesta inmune  $\alpha$ -CLDN18.

Para activar el sistema inmune del ratón y superar la tolerancia inmune, se utilizaron partículas similares a virus (VLP), conjugados peptídicos y proteínas recombinantes que codifican diferentes partes del CLDN18.2 humano expresado como proteínas de fusión recombinantes con diferentes compañeros de expresión (etiquetas).

30 De 13 estrategias de inmunización diferentes, los mejores resultados se lograron tratando ratones con proteína recombinante del terminal C de CLDN18 etiquetada con HIS (véase la Figura 2; Inmunización # 20) en combinación con varios adyuvantes (véase la Tabla 1, a continuación, fusión 35 )

Un candidato (35-22A) resultó de una estrategia de inmunización de 4 etapas (30 días). Se generó un candidato adicional (43-14A) siguiendo un protocolo de inmunización de 7 etapas (79 días) (véase la Tabla 1, a continuación, fusión 43).

Dos días antes de la esplenectomía, los ratones se estimularon para activar las células B dirigidas.

35 El día de la fusión, los esplenocitos de ratón se aislaron y se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón Ag8.653. Para la fusión de células de ratón con el mieloma, se siguió el protocolo estándar publicado por Köhler y Milstein 1975. Después de la selección de HAT, los sobrenadantes se probaron en ELISA para la secreción de anticuerpos que reconocen el antígeno utilizado para las inmunizaciones.

40 Las células de hibridoma de los sobrenadantes positivos de ELISA se subclonaron para generar hibridomas monoclonales y los sobrenadantes de las células de hibridoma subclonado se volvieron a cribar en ELISA. Las células de hibridoma de clones positivos se expandieron y los sobrenadantes se analizaron adicionalmente.

Ejemplo 2: Cribado por transferencia Western de sobrenadantes de hibridoma monoclonal

45 Para responder a la pregunta de si los anticuerpos positivos por ELISA en los sobrenadantes pueden unirse a claudina 18 recombinante o lisados de proteína a partir de células HEK293 que expresan claudina 18 transfectada en forma estable, se realizó un análisis de transferencia Western. Los anticuerpos que fueron capaces de unirse específicamente a claudina 18 en un análisis de transferencia Western se expandieron. Las células se crioconservaron y los anticuerpos se purificaron mediante MABselect (FPLC). Los anticuerpos seleccionados por la detección de transferencia Western se purificaron y se evaluó su capacidad para unir su antígeno en tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (FFPE) mediante inmunohistoquímica.

Ejemplo 3: Análisis histológico - primer cribado de anticuerpos positivos por transferencia Western

El objetivo de este experimento era verificar la especificidad y la sensibilidad de los anticuerpos CLDN18. Esto se realizó utilizando tejido estomacal normal FFPE que expresa CLDN18.

5 En un primer experimento, los anticuerpos purificados probados por transferencia Western se analizaron a una concentración de 0,5 µg/mL en secciones de FFPE de estómago humano. Los anticuerpos que funcionaron bien y no produjeron grandes cantidades de fondo se valoraron adicionalmente a 0,2 y 0,1 µg/mL en varios tejidos estomacales normales para evaluar la sensibilidad y especificidad. En etapas de desarrollo posteriores, los anticuerpos recién generados se probaron directamente a una concentración de 0,2 µg/mL porque el mejor anticuerpo ya se desempeñó muy bien a 0,2 µg/mL y sirvió como punto de referencia. Los anticuerpos que generan señales fuertes en el epitelio de la mucosa de los tejidos del estómago humanos probados y sin antecedentes en los tejidos de la mucosa adyacentes se seleccionaron para más experimentos de valoración y análisis de especificidad. Dos anticuerpos tuvieron un desempeño sobresaliente: 35-22A y 43-14A;

15 Los anticuerpos que producen señales fuertes en el tejido estomacal normal probado se analizaron adicionalmente en tejidos cancerosos. Las células de hibridoma correspondientes se adaptaron a medios libres de suero. Las señales producidas usando mumAb 43-14A fueron ligeramente más fuertes que las señales producidas usando mumAb 35-22A; véase la Tabla 4 a continuación.

Ejemplo 4: Análisis histológico en profundidad y caracterización de anticuerpos

Los anticuerpos producidos sin suero se usaron para teñir microarreglos de tejido CA de estómago (TMA). Se analizaron la cantidad de casos teñidos, la intensidad de la señal y la cantidad de células tumorales positivas.

20 Las intensidades de tinción de los mumAb 35-22A y 43-14A fueron excelentes. No se detectaron diferencias significativas en el patrón de tinción y solo se detectaron ligeras diferencias en las intensidades de tinción entre los anticuerpos probados 35-22A y 43-14A.

Ejemplo 5: Análisis de especificidad de anticuerpos usando un panel de tejido normal

25 Los anticuerpos seleccionados se probaron en varios tejidos normales relevantes para asegurar la alta especificidad objetivo de CLDN18; véase las Tablas 5A y 5B, a continuación.

No se observaron diferencias significativas en el patrón de tinción y las intensidades de tinción de los anticuerpos 35-22A y 43-14A en los experimentos previos. Por lo tanto, los anticuerpos se sometieron a experimentos de tinción con un protocolo más orientado clínicamente. Para simular los procesos de tinción aplicados en los laboratorios de patología estándar, se estableció un protocolo de un día con una etapa de incubación de anticuerpos primarios corta (1 hora).

30 En todos los casos analizados, mumAb 43-14A tuvo un rendimiento extremadamente bueno e incluso mejor en comparación con mumAb 35-22A; véase la Tabla 6 a continuación.

Ejemplo 6: Análisis en profundidad de tejido relevante - epitelio respiratorio

35 mumAb 43-14A se analizó adicionalmente en varios tejidos respiratorios relevantes para asegurar su especificidad, especialmente en tejidos objetivo del tracto pulmonar/bronquial. Para estos tejidos se informó la expresión de CLDN18.1. Para analizar si el anticuerpo de diagnóstico reacciona de forma cruzada con la isoforma expresada de CLDN18.1 en pulmonar/bronquial, se examinaron todos los tejidos pulmonares/bronquiales disponibles. No se detectaron señales con tejidos pulmonares y bronquiales; véase la Tabla 7 a continuación. La isoforma CLDN18 expresada en estos tejidos respiratorios no es reconocida por el anticuerpo 43-14A.

Ejemplo 7: Mapeo de epítomos de los mumAb 43-14A y 35-22A

40 El ELISA de péptido se realizó para identificar los epítomos de unión a anticuerpo en CLDN18.2. Cada anticuerpo purificado se probó en péptidos superpuestos que cubren la secuencia del terminal C de CLDN18.2. 35-22A y 43-14A mostraron ambos unión específica con un mapeo de epítomos al péptido TEDEVQSYPSKHDYV. La siguiente secuencia se determinó como la secuencia reactiva: EVQSYPSKHDYV.

Ejemplo 8: Análisis de secuencia de los mumAb 43-14A y 35-22A

45 En la Figura 3 se muestra un análisis de la secuencia de los anticuerpos 43-14A y 35-22A.

Ejemplo 9: Tinción de diferentes tejidos cancerosos

La inmunohistoquímica (IHC) se realizó en portaobjetos de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina tamponada al 4%. La inclusión en parafina se realizó de acuerdo con los protocolos estándar.

50 Después de la desparafinación, todos los portaobjetos se sometieron a recuperación de antígeno hirviendo en ácido cítrico 10 mM suplementado con Tween-20 al 0,05% (pH 6,0) a 120 °C durante 10 min, posteriormente se inactivó (mediante

5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%), se bloqueó e incubó durante la noche a 4 °C con 0,2 a 0,5 µg/mL de anticuerpo de diagnóstico monoclonal de ratón anti-CLNDN18.2 43-14A o 35-22A. La unión del anticuerpo se visualizó con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante utilizando el anticuerpo Powervision basado en polímero (Power Vision HRP de cabra anti ratón; Immunologic, Duiven, Los Países Bajos) y una solución de cromógeno-sustrato (VectorRed; Vector Labs, Burlingame, EE. UU.). Las secciones fueron posteriormente teñidas con tinción de contraste hematoxilina de Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) y sometidas a evaluación por los evaluadores.

#### Valoración histológica

10 Todas las muestras se analizaron con respecto a la proporción relativa de células tumorales teñidas en forma positiva en relación con todas las células tumorales visibles para cada sección. La intensidad de la tinción se clasificó como negativa (-), débilmente positiva (1+), medianamente positiva (2+) y fuertemente positiva (3+). Solo la tinción membranosa se consideró positiva. El tejido del estómago humano sirvió como control positivo para cada tinción. Dado que PanIN (neoplasia intraepitelial pancreática) se encuentra con frecuencia como fuertemente positiva, esas áreas también se consideraron como referencia interna de intensidad de tinción para una fuerte positividad (3+).

15 Se generaron señales membranosas fuertes por ambos anticuerpos en los tejidos cancerosos pancreático, esofágico y estomacal (Tabla 8) o con el anticuerpo 43-14A en los tejidos cancerosos pulmonares (Tabla 9). El número de células tumorales positivas varió interindividualmente entre los diferentes casos de tumor. La mayor parte de las muestras analizadas fueron 2+ a 3+ positivas.

Tabla 1: Esquemas de inmunización para anticuerpos

| Ratón 5 Inmunización # 20 - Fusión 35 |     |                 |         |              |          |      |                      |           |          |                |         |
|---------------------------------------|-----|-----------------|---------|--------------|----------|------|----------------------|-----------|----------|----------------|---------|
| Fecha                                 | Día | Evento          | Cepa    | ID del ratón | Antígeno |      |                      | Adyuvante |          | Administración |         |
|                                       |     |                 |         |              | [µL]     | [µg] | Código               | [µL]/[µg] | Código   | Ruta           | Volumen |
| 27 de octubre de 2010                 | 0 0 | 1. Inmunización | C57BL/6 | M5           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 4 de noviembre de 2010                | 7 7 | 2. Inmunización | C57BL/6 | M5           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 50/50     | CpG-P70  | ip             | 200 µL  |
| 10 de noviembre de 2010               | 14  | 3. Inmunización | C57BL/6 | M5           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 17 de noviembre de 2010               | 21  | 4. Inmunización | C57BL/6 | M5           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 24 de noviembre de 2010               | 28  | Refuerzo        | C57BL/6 | M5           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 26 de noviembre de 2010               | 30  | Fusión # 35     | C57BL/6 | M5           |          |      |                      |           |          |                |         |
| Ratón 4 Inmunización # 20 - Fusión 43 |     |                 |         |              |          |      |                      |           |          |                |         |
| Fecha                                 | Día | Evento          | Cepa    | ID del ratón | Antígeno |      |                      | Adyuvante |          | Administración |         |
|                                       |     |                 |         |              | [µL]     | [µg] | Código               | [µL]/[µg] | Código   | Ruta           | Volumen |
| 27 de octubre de 2010                 | 0 0 | 1. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 10 de noviembre de 2010               | 14  | 2. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 17 de noviembre de 2010               | 21  | 3. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 24 de noviembre de 2010               | 28  | 4. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 08 de diciembre de 2010               | 42  | 5. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 22 de diciembre de 2010               | 56  | 6. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 5 de enero de 2011                    | 70  | 7. Inmunización | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 12 de enero de 2011                   | 77  | Refuerzo        | BALB/c  | M4           | 100      | 100  | GC182-HIS terminal C | 100       | Gerbu MM | ip             | 200 µL  |
| 14 de enero de 2011                   | 79  | Fusión # 43     | BALB/c  | M4           |          |      |                      |           |          |                |         |

Tabla 2: mumAb positivos seleccionados por análisis de transferencia Western

| Portaobjetos<br>número | Tejido | Anticuerpo | Concentración<br>del anticuerpo | Crio/parafina | epitelio de la<br>mucosa | patrón<br>subcelular | % de Células<br>positivas | bg en lámina<br>propia | Linfocitos | Musculatura<br>lisa |
|------------------------|--------|------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|------------------------|------------|---------------------|
| 11_413                 | humano | 35-22A     | 0,5 µg/mL                       | Parafina      | +++                      | m                    | 90                        | .                      | .          | .                   |
| 11_910                 | humano | 43-14A     | 0,2 µg/mL                       | Parafina      | +++                      | m                    | 90                        | .                      | .          | .                   |

Tabla 3: Comparación de los dos anticuerpos 35-22A y 43-14A en un tejido FFPE de estómago humano normal

| Portaobjetos   | Detalle del tejido | Anticuerpo | Concentración de anticuerpo | Desarrollo | Epitelio de la mucosa | Patrón subcelular | % de Células positivas | bg y células en lámina propia | Linfocitos | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa | Comentarios  |
|--|--------------------|------------|-----------------------------|------------|-----------------------|-------------------|------------------------|-------------------------------|------------|----------------|-------|------------------|--|
| 11_413   | estómago 5         | 35-22A     | 0,5 µg/mL                   | 1:30 min   | +++                   | m                 | 90                     | -                             | -          | -              | -     | -                | Tinción membranosa muy fuerte del epitelio de la mucosa, sin bg en el estroma, vasos y músculos              |
| La 43-14A no fue analizada a 0,5 µg/mL, porque la 35-22A funcionó muy bien a 0,2 µg/mL y sirvió como regla |                    |            |                             |            |                       |                   |                        |                               |            |                |       |                  |  |
| 11_975   | estómago 1         | 35-22A     | 0,1 µg/mL                   | 2:30 min   | +++                   | m                 | 90                     | -                             | -          | -              | -     | -                | Tinción membranosa fuerte del epitelio de la mucosa, sin bg en el estroma, músculos, vasos y o lámina propia |
| 11_975   | estómago 1         | 43-14A     | 0,1 µg/mL                   | 2:30 min   | +++                   | m                 | 90                     | -                             | -          | -              | -     | -                | Tinción membranosa fuerte del epitelio de la mucosa, sin bg en el estroma, músculos, vasos y o lámina propia |
| 11_907   | estómago 5         | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | 2:30 min   | +++                   | m                 | 90                     | -                             | -          | -              | -     | -                | Tinción membranosa fuerte del epitelio de la mucosa, sin bg en el estroma, músculos, vasos y o lámina propia |
| 11_910   | estómago 5         | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | 2:30 min   | +++                   | m                 | 90                     | -                             | -          | -              | -     | -                | Tinción membranosa fuerte del epitelio de la mucosa, sin bg en el estroma, músculos, vasos y o lámina propia |

Tabla 4: Análisis del tejido canceroso – TMA127A

| Portaobjetos número | Detalle del tejido   | Id del tejido | Anticuerpo | Concentración de anticuerpo | Crio/parafina | Desarrollo | Células tumorales | Patrón subcelular | % de Células positivas | Células epiteliales normales | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa |
|---------------------|----------------------|---------------|------------|-----------------------------|---------------|------------|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------------|----------------|-------|------------------|
| 11_474              | CA de estómago (+++) | B04/01221 II  | 35-22A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | ++/+++            | m                 | 90                     | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_474              | CA de estómago (++)  | B06/09514 (5) | 35-22A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | (+)/+             | c/m               | 10                     | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_474              | CA de estómago (+)   | B05/09809 (4) | 35-22A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | -                 | n. a.             | 0                      | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_474              | CA renal             | B08/13471 (3) | 35-22A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | -                 | n. a.             | 0                      | n. a.                        | -              | -     | n. a.            |
| 11_475              | CA de estómago (+++) | B04/01221 II  | 43-14A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | +++               | m                 | 90                     | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_475              | CA de estómago (++)  | B06/09514 (5) | 43-14A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | (+)/+             | m/c               | 10                     | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_475              | CA de estómago (+)   | B05/09809 (4) | 43-14A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | -                 | -                 | 0                      | n. a.                        | -              | -     | -                |
| 11_475              | CA renal             | B08/13471 (3) | 43-14A     | 0,1 µg/mL                   | Parafina      | 2:30 min   | -                 | n. a.             | 0                      | n. a.                        | -              | -     | n. a.            |

Tabla 5A: Análisis de tejido normal

| Portaobjetos número | Tejido   | Id del tejido | Anticuerpo | Concentración de anticuerpo | Crio/parafina | Desarrollo | Células epiteliales normales y tejido funcional | Patrón subcelular | % de Células positivas | Linfocitos | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa | Tejido graso |
|---------------------|----------|---------------|------------|-----------------------------|---------------|------------|---|-------------------|------------------------|------------|----------------|-------|------------------|--------------|
| 11_577              | Estómago | Estómago 9    | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 00 : 50    | ++/+++  | m                 | 90                     | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_1756             | Estómago | Estómago 9    | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 00 : 50    | +++   | m.                | >90                    | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_580              | Colon    | Colon 2       | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_1753             | Colon    | Colon 2       | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_586              | Riñón    | Riñón 2       | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_1454             | Riñón    | Riñón 2       | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | n. a.      | -              | -     | -                | -            |
| 11_589              | Pulmón   | Pulmón 2      | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_1663             | Pulmón   | Pulmón 2      | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 03 : 00    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_595              | Páncreas | Páncreas 3    | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1749             | Páncreas | Páncreas 3    | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | n. a.      | -              | -     | -                | -            |
| 11_599              | Hígado   | Hígado 1      | 35-22A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1751             | Hígado   | Hígado 1      | 43-14A     | 0,2 µg/mL                   | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | n. a.      | -              | -     | -                | -            |

Tabla 5B: Análisis de tejido normal - 43-14 A

| Portaobjetos número | Tejido   | Id del tejido | Anticuerpo | Concentración anticuerpo | Crio/parafina | Desarrollo | Células epiteliales normales y tejido funcional | Patrón subcelular | % de Células positivas | Linfocitos | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa | Tejido graso |
|---------------------|----------|---------------|------------|--------------------------|---------------|------------|---|-------------------|------------------------|------------|----------------|-------|------------------|--------------|
| 11_1748             | Páncreas | Páncreas 5    | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1750             | Hígado   | Hígado 4. 5   | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1755             | Riñón    | Riñón 3       | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1757             | Estómago | Estómago 12   | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | +++   | m                 | >90                    | -          | -              | -     | -                | n. a.        |
| 11_1758             | Corazón  | Corazón 1     | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_1759             | Corazón  | Corazón 2     | 43-14A SF  | 0,2 µg/mL                | Parafina      | 02 : 15    | -   | n. a.             | n. a.                  | n. a.      | -              | -     | -                | -            |

Tabla 6: Análisis de tejido normal – Protocolo de un día

| Portaobjetos | Tejido    | Id del tejido | Anticuerpo | Concentración anticuerpo | Desarrollo | Tejido funcional | tejido tumoral | Patrón subcelular | % de Células positivas | Linfocitos | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa | Tejido graso |
|--------------|-----------|---------------|------------|--------------------------|------------|------------------|----------------|-------------------|------------------------|------------|----------------|-------|------------------|--------------|
| 11_2092      | Estómago  | Estómago 9    | 43-14A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | ++/+++           | n. a.          | m                 | >90                    | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_2092      | Estómago  | Estómago 9    | 35-22A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | +/++             | n. a.          | m                 | >90                    | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_2092      | Estómago  | Estómago 9    | 43-14A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | +++              | n. a.          | m                 | >90                    | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_2092      | Estómago  | Estómago 9    | 35-22A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | +                | n. a.          | m                 | 70-80                  | -          | -              | -     | -                | -            |
| 11_2092      | TMA 127 A | TMA 127 A     | 43-14A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | n. a.            | +/++           | m                 | 90                     | -          | -              | -     | n. a.            | n. a.        |
| 11_2092      | TMA 127 A | TMA 127 A     | 35-22A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | n. a.            | +              | m                 | <5                     | -          | -              | -     | n. a.            | n. a.        |
| 11_2092      | TMA 127 A | TMA 127 A     | 43-14A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | n. a.            | +/++           | m                 | 90                     | -          | -              | -     | n. a.            | n. a.        |
| 11_2092      | TMA 127 A | TMA 127 A     | 35-22A     | 0,1 µg/mL                | 03 : 30    | n. a.            | - / (+)        | C                 | <5                     | -          | -              | -     | n. a.            | n. a.        |

Tabla 7: Análisis del tejido respiratorio normal

| Portaobjetos número | Id del tejido | Anticuerpo  | Concentración de anticuerpo | Células epiteliales normales | Patrón subcelular | % de Células positivas | Linfocitos | Tejido fibroso | Vasos | Musculatura lisa |
|---------------------|---------------|-------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|------------|----------------|-------|------------------|
| 11_1660             | pulmón 1      | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | n.a.       | -              | -     | -                |
| 11_1660             | pulmón 1      | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | n.a.       | -              | -     | -                |
| 11_1663             | pulmón 2      | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1663             | pulmón 2      | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1666             | pulmón 3      | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1666             | pulmón 3      | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1669             | pulmón 4      | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1669             | pulmón 4      | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1672             | pulmón 5      | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1672             | pulmón 5      | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1675             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1675             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1678             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1678             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1681             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1681             | bronquial     | muAb 43-14A | 0,5 µg/mL                   | -                            | -                 | -                      | -          | -              | -     | -                |
| 11_1684             | estómago 9    | muAb 43-14A | 0,2 µg/mL                   | +++                          | m                 | > 90                   | -          | n.a.           | -     | -                |

Tabla 8: Análisis de la expresión de CLDN18.2 en tejidos cancerosos esofágicos, pancreáticos y estomacales, utilizando los anticuerpos monoclonales murinos 43-14A y 35-22A

| ID del tejido      | Ab     | Tejido         | Detalles del subtipo             | Células tumorales | % de células positivas |
|--------------------|--------|----------------|----------------------------------|-------------------|------------------------|
| H/2010/10869 IVG   | 43-14A | CA de páncreas | Carcinoma de células acinares    | -                 | 0 0                    |
| 1125005.22         | 43-14A | CA de páncreas | Carcinoma neuroendocrino         | ++                | 70                     |
| H/2006/22797 ** IA | 43-14A | CA de páncreas | Carcinoma neuroendocrino         | -                 | 0 0                    |
| B08/6284-VC        | 35-22A | CA de páncreas | Carcinoma neuroendocrino, NET G1 | -                 | 0 0                    |

ES 2 763 965 T3

| ID del tejido      | Ab     | Tejido         | Detalles del subtipo             | Células tumorales | % de células positivas |
|--------------------|--------|----------------|----------------------------------|-------------------|------------------------|
| B08/8549-4         | 35-22A | CA de páncreas | Carcinoma neuroendocrino, NET G1 | -                 | 0 0                    |
| B05/8523-3         | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 1                      |
| B06/16136-NP2      | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 50                     |
| B07/14168          | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 80                     |
| B07/14935          | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | -                 | 0 0                    |
| B07/2633-III3      | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 90                     |
| B07/7430           | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 90                     |
| B08/5618-2         | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 80                     |
| B10/14198-VC       | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 80                     |
| B10/706-VC3        | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 60 60                  |
| B11/2059-D         | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 80                     |
| B11/4084           | 35-22A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 90                     |
| 1125005.30         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | -                 | 0 0                    |
| 1125005.27         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 10                     |
| 1125005.24         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 50                     |
| 1125005.23         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | ++                | 100                    |
| 1125005.25         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 30                     |
| 1125005.28         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 80                     |
| H/2008/13074       | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 40                     |
| H/2008/13194       | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 50                     |
| H/2008/380         | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 90                     |
| H/2009/11847       | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 15                     |
| H/2009/20336       | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 90                     |
| H/2009/23598 VII B | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 40                     |
| H/2010/11569       | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                             | +++               | 80                     |

ES 2 763 965 T3

| ID del tejido                            | Ab     | Tejido         | Detalles del subtipo | Células tumorales | % de células positivas |
|--|--------|----------------|----------------------|-------------------|------------------------|
| H/2011/17191 VA                          | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                 | +++               | 60 60                  |
| H/2009/4917                              | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                 | +++               | 70                     |
| H/2010/15941                             | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                 | +++               | 50                     |
| H/2010/6709                              | 43-14A | CA de páncreas | PDAC                 | +++               | 70                     |
| 1125005.19                               | 43-14A | CA de esófago  | adenocarcinoma       | ++                | 50                     |
| B09/1491-III-2                           | 43-14A | CA de esófago  | adenocarcinoma       | -                 | 0 0                    |
| 06/14957-2                               | 43-14A | CA de esófago  | adenocarcinoma       | ++                | 30                     |
| 1125005.17                               | 43-14A | CA de esófago  | adenocarcinoma       | +++               | 70                     |
| 1083435B                                 | 43-14A | CA de esófago  | adenocarcinoma       | ++                | 70                     |
| 10b06684-II-3                            | 43-14A | CA de estómago | adenocarcinoma       | +++               | 80                     |
| 1125005.10                               | 43-14A | CA de estómago | adenocarcinoma       | ++                | 30                     |
| 1125005.6                                | 43-14A | CA de estómago | adenocarcinoma       | ++                | 90                     |
| PDAC = adenocarcinoma ductal pancreático |        |                |                      |                   |                        |

Tabla 9: Análisis de la expresión de CLDN18.2 en tejidos cancerosos de pulmón, usando el anticuerpo monoclonal murino 43-14A

|                |           |                            | Células tumorales |     |
|----------------|-----------|----------------------------|-------------------|-----|
| B09/14758-3    | 0,2 µg/mL | tipo bronquiolo-alveolar   | -                 | -   |
| B09/18323-IV5  | 0,2 µg/mL | tipo bronquiolo-alveolar   | -                 | -   |
| B10/13211-VC4  | 0,2 µg/mL | tipo bronquiolo-alveolar   | +++               | 80% |
| B07/4771-3     | 0,2 µg/mL | carcinoide                 | -                 | -   |
| B07/5358 II2   | 0,2 µg/mL | carcinoide                 | -                 | -   |
| B08/3382-1     | 0,2 µg/mL | carcinoide                 | -                 | -   |
| B08/8898-II6   | 0,2 µg/mL | Carcinoma, células claras  | +                 | <1% |
| B09/12293 II2  | 0,2 µg/mL | Carcinoma, espinocelular   | -                 | -   |
| B06/12562-III3 | 0,2 µg/mL | Carcinoma, células grandes | -                 | -   |

ES 2 763 965 T3

|               |           |  | Células tumorales |     |
|---------------|-----------|--|-------------------|-----|
| B06/10820-II2 | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | -                 | -   |
| B06/10876-2   | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | -                 | -   |
| B06/16831-I3  | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | +++               | 80% |
| B07/03255 IV5 | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | +++               | 5%  |
| B07/2296-3    | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | -                 | -   |
| B07/709 II4   | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | ++                | <5% |
| B10/12713-II1 | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | ++                | <5% |
| B10/14197-2   | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | -                 | -   |
| B10/16367-V2  | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno                           | +                 | 1%  |
| B09/1743 II3  | 0,2 µg/mL | carcinoma, adeno, escamoso                 | -                 | -   |
| B09/17916-1   | 0,2 µg/mL | carcinoma, células grandes                 | -                 | -   |
| B10/10814-3   | 0,2 µg/mL | carcinoma, células grandes, neuroendocrino | +                 | 1%  |
| B010/10646    | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B06/3204-2    | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B08/292-2     | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | ++                | <5% |
| B08/7434-IV   | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B09/45-2      | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B10/10-2      | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | +                 | <1% |
| B10/11714     | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B10/15779     | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B10/17043     | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B10/18106     | 0,2 µg/mL | carcinoma, células escamosas               | -                 | -   |
| B07/6782-1    | 0,2 µg/mL | carcinoma; adeno, célula clara             | ++                | <1% |
| B07/9741-5    | 0,2 µg/mL | carcinoma; adeno, célula clara             | -                 | -   |
| B08/16425-2   | 0,2 µg/mL | células grandes neuroendocrinas            | ++                | <5% |

## ES 2 763 965 T3

|                |           |                                  | Células tumorales |     |
|----------------|-----------|----------------------------------|-------------------|-----|
| B08/3019-V3    | 0,2 µg/mL | CA de células no pequeñas        | -                 | -   |
| B08/1099 V3    | 0,2 µg/mL | CA de pulmón células no pequeñas | -                 | <1% |
| B08/12010-2    | 0,2 µg/mL | CA de pulmón células no pequeñas | ++                | <1% |
| B10/17662-III3 | 0,2 µg/mL | carcinoma de células pequeñas    | -                 | -   |

### Listado de secuencias

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

<120> Anticuerpos útiles en el diagnóstico de cáncer

5 <130> 342-70 PCT

<150> PCT/EP2012/001991

<151> 2012-05-09

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 763 965 T3

Met Ser Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Ala Phe Leu Leu Ser Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr  
 20 25 30  
 Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly  
 35 40 45  
 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60  
 Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80  
 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val  
 85 90 95  
 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser  
 100 105 110  
 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
 115 120 125  
 Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140  
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160  
 Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
 165 170 175  
 Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
 180 185 190  
 Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
 195 200 205  
 Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
 210 215 220  
 Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225 230 235 240  
 Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
 245 250 255  
 Lys His Asp Tyr Val  
 260

<210> 2

<211> 261

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 763 965 T3

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr  
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val  
260

<210> 3

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

ES 2 763 965 T3

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

Gly Phe Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly  
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn  
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg  
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn  
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser  
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val  
 260

<210> 4

<211> 261

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 763 965 T3

<223> Secuencia de consenso

<220>

<221> Característica miscelánea

<222> (18)..(18)

5 <223> Aminoácido variable

<400> 4

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

Gly xaa Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr  
20 25 30

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

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

ES 2 763 965 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
245 250 255

Lys His Asp Tyr Val  
260

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido para inmunización

<400> 5

Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val  
1 5 10 15

10 <210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 763 965 T3

<220>

<223> Péptido para inmunización

<400> 6

Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val  
 1 5 10

5 <210> 7

<211> 134

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

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

10

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

ES 2 763 965 T3

<400> 9

Ile Asn Thr Glu Thr Gly Val Pro  
1 5

<210> 10

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Ala Arg Arg Thr Gly Phe Asp Tyr  
1 5

<210> 11

10 <211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro  
1 5 10 15

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

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

Leu Leu His Ser Asp Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala  
65 70 75 80

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

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Val Gln Val Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys  
130

15 <210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

20 Lys Asn Leu Leu His Ser Asp Gly Ile Thr Tyr  
1 5 10

ES 2 763 965 T3

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 13

Arg Val Ser  
1

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 14

Val Gln Val Leu Glu Leu Pro Phe Thr  
1 5

<210> 15

<211> 140

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly  
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu  
50 55 60

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

Asp Asn Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
85 90 95

Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile  
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr Asp Asn Ser Tyr Val Arg Asp  
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
130 135 140

20 <210> 16

<211> 8

ES 2 763 965 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

5 <210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Ile Ser Asp Gly Gly Ser Tyr Ser  
1 5

10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 18

Ala Arg Asp Ser Tyr Tyr Asp Asn Ser Tyr Val Arg Asp Tyr  
1 5 10

<210> 19

<211> 127

<212> PRT

20

<213> Mus musculus

<400> 19

Met Arg Thr Pro Ala Gln Phe Leu Gly Ile Leu Leu Leu Trp Phe Pro  
1 5 10 15

Gly Ile Lys Cys Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr  
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp  
35 40 45

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
85 90 95

Ser Leu Asp Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp

ES 2 763 965 T3

100 105 110

Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 115 120 125

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 20

Gln Asp Ile Asn Thr Phe  
 1 5

<210> 21

<211> 3

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Arg Thr Asn  
 1

<210> 22

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr  
 1 5

20 <210> 23

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Ácido nucleico que codifica un péptido para inmunización

<400> 23

|  |     |
|--|-----|
| atgcggggtt ctcacatca tcatcatcat ggtatggcta gcatgactgg tggacagcaa   | 60  |
| atgggctcggg atctgtacga cgatgacgat aaggatcgat ggggatccga gctcgagatg | 120 |
| atgtgcatcg cctgccgggg cctggcacca gaagaaacca actacaaagc cgtttcttat  | 180 |
| catgcctcgg gccacagtgt tgcctacaag cctggaggct tcaaggccag cactggcttt  | 240 |
| gggtccaaca ccaaaaacaa gaagatatac gatggagggtg cccgcacaga ggacgaggta | 300 |
| caatcttatc cttccaagca cgactatgtg                                   | 330 |

<210> 24

<211> 110

ES 2 763 965 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido para inmunización

5 <400> 24

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

<210> 25

<211> 71

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido para inmunización

<400> 25

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

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que
  - (i) se une a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 5) o EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 6) y/o
  - 5 (ii) se une a claudina 18.2 (CLDN18.2), en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CLDN18.2 mediante la unión a al menos a un epítipo dentro de CLDN18.2 que tiene la secuencia de aminoácidos TEDEVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 5) o EVQSYPSKHDYV (SEQ ID NO: 6).
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho CLDN18.2 es CLDN18.2 unido a la membrana de la superficie celular.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho CLDN18.2 está presente en células cancerosas.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 3, en el que dichas células cancerosas son células cancerosas que expresan CLDN18.2.
- 15 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 3 o 4, en el que dichas células cancerosas se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza-cuello y de vesícula biliar.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que no se une a células no cancerosas excepto a las células epiteliales del estómago.
- 20 7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que no se une a células pulmonares no cancerosas.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un anticuerpo monoclonal.
10. Un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:
  - 25 (i) un anticuerpo producido u obtenible de un clon depositado bajo el número de acceso DSM ACC3144 (muAB 43-14A) o DSM ACC3143 (muAB 35-22A),
  - (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo bajo (i), y
  - (iii) un anticuerpo que comprende la porción de unión a antígeno o el sitio de unión a antígeno del anticuerpo bajo (i), o
  - (iv) un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo bajo cualquiera de (i) a (iii).
- 30 11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en el que la porción de unión a antígeno o el sitio de unión a antígeno del anticuerpo bajo (i) comprende la región variable del anticuerpo bajo (i).
12. Un conjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 acoplado a al menos un marcador detectable.
13. Un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
14. Un hibridoma depositado bajo el acceso no. DSM ACC3144 (muAB 43-14A) o DSM ACC3143 (muAB 35-22A).
- 35 15. Un método para detectar CLDN18.2 o determinar la cantidad de CLDN18.2 en una muestra que comprende las etapas de:
  - (i) poner en contacto una muestra con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el conjugado de la reivindicación 12 y
  - 40 (ii) detectar la formación de un complejo o determinar la cantidad de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno o el conjugado y CLDN18.2.
16. Un método para determinar si las células expresan CLDN18.2 que comprende las etapas de:
  - (i) poner en contacto una muestra celular con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el conjugado de la reivindicación 12 y
  - 45 (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2 expresado por las células en dicha muestra.

17. Un método para el diagnóstico, detección o monitoreo del cáncer que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una muestra biológica con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el conjugado de la reivindicación 12 y

5 (ii) detectar la formación de un complejo y/o determinar la cantidad de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2.

18. Un método para determinar si un cáncer es tratable mediante una terapia contra el cáncer dirigida a CLDN18.2 que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto una muestra que comprende células cancerosas con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el conjugado de la reivindicación 12 y

10 (ii) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o el conjugado y CLDN18.2.

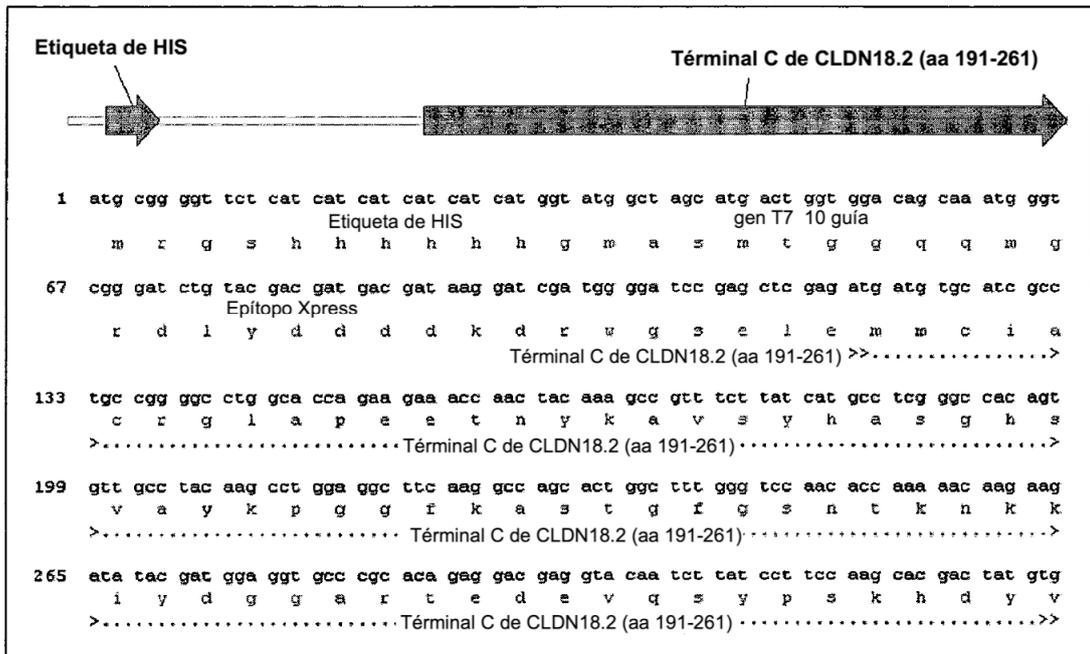
19. Un kit de prueba de diagnóstico que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el conjugado de la reivindicación 12.

15 20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el conjugado de la reivindicación 12, el hibridoma de la reivindicación 13 o 14, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que dicho CLDN18.2 comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

**Figura 1**

|                 |            |             |            |            |            |     |
|-----------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
|                 | 1          | Hélice TM   |            |            |            | 50  |
| HsCld18.1       | MSTTTCQVVA | FLLSILGLAG  | CIAATGMDMW | STQDLYDNPV | TSVFQYEGW  |     |
| HsCld18.2       | MAVTACQGLG | FVVSILIGIAG | IIAATCMDQW | STQDLYNNPV | TAVFNYQGLW |     |
| MmCld18.2       | MSVTACQGLG | FVVSILIGFAG | IIAATCMDQW | STQDLYNNPV | TAVFNYQGLW |     |
| <b>Consenso</b> | MsvTaCQglg | FvvSliGxAG  | iIAATcMDqW | STQDLYnNPV | TaVFnYqGLW |     |
|                 | 51         |             |            | Hélice TM  |            | 100 |
| HsCld18.1       | RSCVRQSSGF | TECRPYFTIL  | GLPAMLQAVR | ALMIVGIVLG | AIGLLVSIFA |     |
| HsCld18.2       | RSCVRESSGF | TECRGYFTLL  | GLPAMLQAVR | ALMIVGIVLG | AIGLLVSIFA |     |
| MmCld18.2       | RSCVRESSGF | TECRGYFTLL  | GLPAMLQAVR | ALMIVGIVLG | VIGILVSIFA |     |
| <b>Consenso</b> | RSCVReSSGF | TECRgYFTLL  | GLPAMLQAVR | ALMIVGIVLG | aIGLLVSIFA |     |
|                 | 101        |             | Hélice TM  |            |            | 150 |
| HsCld18.1       | LKCIRIGSME | DSAKANMTLT  | SGIMFIVSGL | CAIAGVSVFA | NMLVTNFWMS |     |
| HsCld18.2       | LKCIRIGSME | DSAKANMTLT  | SGIMFIVSGL | CAIAGVSVFA | NMLVTNFWMS |     |
| MmCld18.2       | LKCIRIGSMD | DSAKAKMTLT  | SGILFIISGI | CAIIGVSVFA | NMLVTNFWMS |     |
| <b>Consenso</b> | LKCIRIGSMe | DSAKAnMTLT  | SGImFIvSGL | CAIaGVSVFA | NMLVTNFWMS |     |
|                 | 151        |             |            | Hélice TM  |            | 200 |
| HsCld18.1       | TANMYTGMGG | M---VQTVQT  | RYTFGAALFV | GWVAGGLTLI | GGVMCCIACR |     |
| HsCld18.2       | TANMYTGMGG | M---VQTVQT  | RYTFGAALFV | GWVAGGLTLI | GGVMCCIACR |     |
| MmCld18.2       | TANMYSGMGG | MGGMVQTVQT  | RYTFGAALFV | GWVAGGLTLI | GGVMCCIACR |     |
| <b>Consenso</b> | TANMYtGMGG | M...VQTVQT  | RYTFGAALFV | GWVAGGLTLI | GGVMCCIACR |     |
|                 | 201        |             |            |            |            | 250 |
| HsCld18.1       | GLAPEETNYK | AVSYHASGHS  | VAYKPGGFKA | STGFGSNTKN | KKIYDGGART |     |
| HsCld18.2       | GLAPEETNYK | AVSYHASGHS  | VAYKPGGFKA | STGFGSNTKN | KKIYDGGART |     |
| MmCld18.2       | GLTPDDSNFK | AVSYHASGQN  | VAYRPGGFKA | STGFGSNTRN | KKIYDGGART |     |
| <b>Consenso</b> | GLaPeetNyK | AVSYHASGhs  | VAYkPGGFKA | STGFGSNTkN | KKIYDGGART |     |
|                 | 251        | 264         |            |            |            |     |
| HsCld18.1       | EDEVQSYPSK | HDYV        |            |            |            |     |
| HsCld18.2       | EDEVQSYPSK | HDYV        |            |            |            |     |
| MmCld18.2       | EDDEQSHPTK | YDYV        |            |            |            |     |
| <b>Consenso</b> | EDevQSyPsK | hDYV        |            |            |            |     |

Figura 2



**Figura 3**

**Cadena Pesada**

|            |             |            |            |                            |
|------------|-------------|------------|------------|----------------------------|
|            | 1           | Guía       |            | 50                         |
| H-43-14A_2 | MAWVWTLLEFL | MAAAQSIQAQ | IQLVQSGPEL | KKFGETVKIS CKASGYTFTD CDR1 |
| H-35-22A_1 | MNFGSLIFL   | VLVLKGVQCE | VHLVESGGGL | VKPGGSLKLS CAASGTFESS      |
|            | 51          |            | CDR2       | 100                        |
| H-43-14A_2 | YSLHWVKQAP  | GKGLKWMGWI | NTETGVPTYA | DDFKGRFAFS LETSASTAYL      |
| H-35-22A_1 | YAMSWVRQTP  | EKRLEWVATI | SDGGSYSYYP | DNVKGRTIS RDNAKNNLYL       |
|            | 101         |            | CDR3       | 140                        |
| H-43-14A_2 | QINNLKNETD  | ATYFCARRTG | FD-----YW  | GQGTTLVSS                  |
| H-35-22A_1 | QMSHLKSED   | AIYYCARSY  | YDNSYVRDYW | GQGTTLVSS                  |

**Cadena Ligera**

|            |            |            |            |                            |
|------------|------------|------------|------------|----------------------------|
|            | 1          | Guía       |            | 50                         |
| LN-43-14A_ | MRFSAQLLGL | LVLWIPGSTA | DIVMTQAAFS | IPVTLGTSAS ISCRSSKNLL CDR1 |
| LN-35-22A_ | MRTPAQFLGI | LLLWFPGIKC | DIKMTQSPSS | MYASLGERVS ITCKASQDIN      |
|            | 51         |            | CDR2       | 100                        |
| LN-43-14A_ | HSDGITYLYW | YLQRPQSPQ  | LLIYRVS    | NLA SGVPNRFSGS ESGTDFTLRI  |
| LN-35-22A_ | -----TFLSW | FQOKPGKSPK | TLIYRTN    | RLI DGVPSRFSGS GSGQDYSLTI  |
|            | 101        |            | CDR3       | 132                        |
| LN-43-14A_ | SRVEAEDVGV | YYCVQVLELP | FTFGGGTKLE | IK                         |
| LN-35-22A_ | SSLDYEDMGI | YYCLQYDEFP | LTFGAGTKLE | LK                         |