(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 765 949**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014 PCT/EP2014/000719**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14146778**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014 E 14714586 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2976360**

(54) Título: **Terapia que involucra anticuerpos contra la claudina 18.2 para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

18.03.2013 WO PCT/EP2013/000817

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2020

(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 (50.0%)

(72) Inventor/es:

SAHIN, UGUR y
TÜRECI, ÖZLEM

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

DESCRIPCIÓN

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

Los cánceres de estómago y esófago (gastroesofágico; GE) se encuentran entre los tumores malignos con la mayor necesidad médica insatisfecha. El cáncer gástrico es la segunda causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. La incidencia del cáncer de esófago ha aumentado en las últimas décadas, lo que coincide con un cambio en el tipo histológico y la ubicación del tumor primario. El adenocarcinoma de esófago tiene ahora más prevalencia que el carcinoma de células escamosas en los Estados Unidos y Europa occidental, con la mayoría de los tumores ubicados en el esófago distal. La tasa general de supervivencia a cinco años para el cáncer GE es del 20-25 %, a pesar de la agresividad del tratamiento estándar establecido asociado con efectos secundarios sustanciales.

La mayoría de los pacientes se presentan con enfermedad localmente avanzada o metastásica y tienen que someterse a quimioterapia de primera línea. Los regímenes de tratamiento se basan en una estructura de derivados de platino y fluoropirimidina combinados principalmente con un tercer compuesto (por ejemplo, taxanos o antraciclinas). Aun así, la mediana de supervivencia libre de progresión de 5 a 7 meses y la mediana de supervivencia general de 9 a 11 meses son las mejores que pueden esperarse.

La ausencia de un beneficio importante de los diversos regímenes de quimioterapia combinada de nueva generación para estos cánceres ha estimulado la investigación sobre el uso de agentes dirigidos. Recientemente, para los cánceres gastroesofágicos positivos para Her2/neu, se ha aprobado el Trastuzumab. Sin embargo, como solo ~20 % de los pacientes expresan el objetivo y son elegibles para este tratamiento, la necesidad médica continúa elevada.

La molécula de la unión estrecha variante de empalme 2 de la Claudina 18 (Claudina 18.2 (CLDN18.2)) es un miembro de la familia claudina de las proteínas de unión estrecha. La CLDN18.2 es una proteína transmembrana de 27,8 kDa que comprende cuatro dominios que se extienden por la membrana con dos bucles extracelulares pequeños.

En tejidos normales no hay expresión detectable de la CLDN18.2 mediante RT-PCR con excepción del estómago. La inmunohistoquímica con anticuerpos específicos de CLDN18.2 revela que el estómago es el único tejido positivo.

La CLDN18.2 es un antígeno de linaje gástrico altamente selectivo expresado exclusivamente en células del epitelio gástrico diferenciadas de vida corta. La CLDN18.2 se mantiene en el curso de la transformación maligna y, por lo tanto, se presenta frecuentemente en la superficie de las células cancerosas gástricas humanas. Además, este antígeno pantumoral se activa de manera ectópica a niveles significativos en adenocarcinomas de esófago, páncreas y pulmón. La proteína CLDN18.2 se localiza, además, en la metástasis en los ganglios linfáticos de los adenocarcinomas de cáncer gástrico y en la metástasis a distancia, especialmente en el ovario (llamados tumores de Krukenberg).

El anticuerpo IgG1 quimérico IMAB362 que se dirige contra la CLDN18.2 se ha desarrollado por Ganymed Pharmaceuticals AG. El IMAB362 reconoce el primer dominio extracelular (ECD1) de la CLDN18.2 con alta afinidad y especificidad. El IMAB362 no se une a ningún otro miembro de la familia claudina, lo que incluye la variante de empalme 1 relacionada estrechamente de la Claudina 18 (CLDN18.1). El IMAB362 muestra una especificidad precisa por las células tumorales y agrupa cuatro mecanismos de acción independientes altamente potentes. Al unirse al objetivo, el IMAB362 media la muerte celular por ADCC, CDC e inducción de apoptosis inducida por reticulación del objetivo en la superficie de la célula tumoral e inhibición directa de la proliferación. De esta forma, el IMAB362 lisa eficientemente las células positivas para CLDN18.2, lo que incluye líneas celulares de cáncer gástrico humano *in vitro* e *in vivo.* Los ratones que portan líneas celulares cancerosas positivas para CLDN18.2 tienen un beneficio de supervivencia y hasta el 40 % de los ratones muestra regresión de su tumor cuando se tratan con IMAB362. El documento WO2007/059997 describe el IMAB362 y varios otros anticuerpos monoclonales murinos y quiméricos. Este documento de la técnica anterior demuestra, además, que el IMAB362 y algunos de los otros anticuerpos identificados se unen a la CLDN18.2 e inducen la muerte de las células que expresan CLDN18.2 en su superficie. Además, el documento WO2007/059997 establece que cuando se prueba en un modelo de tumor de ratón, algunos de los anticuerpos identificados reducen el crecimiento tumoral y aumentan el tiempo de supervivencia de los ratones evaluados.

La toxicidad y el perfil PK/TK del IMAB362 se han examinado a fondo en ratones y monos cynomolgus, lo que incluye los estudios de búsqueda de intervalo de dosis, estudios de toxicidad a dosis repetidas de 28 días en cynomolgus y un estudio de toxicidad a dosis repetidas de 3 meses en ratones. Tanto en ratones (administración semanal de mayor duración del tratamiento durante 3 meses, niveles de dosis más altos de 400 mg/kg) como en monos cynomolgus (hasta 5 aplicaciones semanales de hasta 100 mg/kg) las dosis repetidas de IMAB362 i.v. se toleran bien. No se inducen signos de toxicidad sistémica o local. Específicamente, no se ha observado toxicidad gástrica en ningún estudio de toxicidad. IMAB362 no induce la activación inmunitaria y la liberación de citocinas. No se registraron efectos adversos en los órganos reproductores de machos o hembras. IMAB362 no se une a los tejidos que carecen del objetivo. Los estudios de biodistribución en ratones indican que la razón de la falta de toxicidad gástrica es más probablemente la compartimentación de las uniones estrechas en el sitio luminal en epitelios gástricos sanos, lo que parece afectar profundamente la accesibilidad del epítopo de IMAB362. Esta compartimentación se pierde tras una transformación maligna lo que hace que el epítopo pueda modificarse farmacológicamente por IMAB362.

Aquí presentamos datos que demuestran que la administración de un anticuerpo anti-CLDN18.2 tal como IMAB362 a pacientes humanos con cáncer gastroesofágico es segura y bien tolerada hasta una dosis de al menos 1000 mg/m^2. Además, los datos presentados en la presente descripción demuestran que el anticuerpo es completamente funcional en estos pacientes para ejecutar efectos contra las células antitumorales y se obtuvo evidencia de actividad antitumoral.

Resumen de la enseñanza

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

En un primer aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, en donde el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de al menos 40 µg/ml. En diferentes modalidades, el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de al menos 50 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 400 µg/ml o al menos 500 µg/ml. En diferentes modalidades, el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de no más de 800 µg/ml, 700 µg/ml, 600 µg/ml, 550 µg/ml o 500 µg/ml. En una modalidad, el nivel sérico proporcionado está entre 40 µg/ml y 700 µg/ml, preferentemente, 40 µg/ml y 600 µg/ml, preferentemente, 50 µg/ml y 500 µg/ml, tal como entre 150 µg/ml y 500 µg/ml o 300 µg/ml y 500 µg/ml. Por el término "nivel sérico", como se usa en la presente descripción, se entiende una concentración de la sustancia en cuestión en el suero sanguíneo. En una modalidad, el nivel sérico se proporciona durante al menos 7 días o al menos 14 días. En una modalidad, el método comprende administrar una dosis/varias dosis del anticuerpo de al menos 300 mg/m^2 tal como al menos 600 mg/m^2 y, preferentemente, hasta 1500 mg/m^2, hasta 1200 mg/m^2 o hasta 1000 mg/m^2.

En un segundo aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, en donde el anticuerpo se administra a una dosis de al menos 300 mg/m^2 tal como al menos 600 mg/m^2 y, preferentemente, hasta 1500 mg/m^2, hasta 1200 mg/m^2 o hasta 1000 mg/m^2.

En un tercer aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, en donde al menos el 50 %, preferentemente, el 60 %, el 70 %, el 80 % o el 90 % de las células cancerosas del paciente son positivas para CLDN18.2 y/o al menos el 40 %, preferentemente, el 50 % o el 60 % de las células cancerosas del paciente son positivas para la expresión superficial de la CLDN18.2. En este aspecto, la presente enseñanza proporciona, además, un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa, dicho método comprende: a. identificar un paciente que exhibe al menos 50 %, preferentemente, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de células cancerosas positivas para la CLDN18.2 y/o al menos el 40 %, preferentemente, el 50 % o el 60 % de células cancerosas que son positivas para la expresión superficial de la CLDN18.2; y b. administrar a dicho paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2. En una modalidad, al menos el 95 % o al menos el 98 % de las células cancerosas del paciente son positivas para la CLDN18.2. En una modalidad, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de las células cancerosas del paciente son positivas para la expresión superficial de la CLDN18.2.

En una modalidad del método de cualquiera de los aspectos descritos en la presente descripción, el tratamiento de la enfermedad cancerosa resulta en lograr una enfermedad estable. En una modalidad, la enfermedad estable se logra durante al menos 2 meses, al menos 3 meses o al menos 6 meses.

En un cuarto aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para lograr una enfermedad estable en un paciente con cáncer que comprende administrar al paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2. En una modalidad, la enfermedad estable se logra durante al menos 2 meses, al menos 3 meses o al menos 6 meses.

En una modalidad del método de cualquiera de los aspectos descritos en la presente descripción, el anticuerpo se administra en una dosis única o en dosis múltiples.

En un quinto aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, en donde el anticuerpo se administra en dosis múltiples.

Si de acuerdo con la enseñanza el anticuerpo se administra en dosis múltiples, el anticuerpo se administra, preferentemente, en al menos 3 dosis, al menos 4 dosis, al menos 5 dosis, al menos 6 dosis, al menos 7 dosis, al menos 8 dosis, a al menos 9 dosis o al menos 10 dosis y, preferentemente, hasta 30, 25, 20, 15 o 10 dosis. Las dosis del anticuerpo se administran, preferentemente, en intervalos de tiempo de al menos 7 días, al menos 10 días, al menos 14

días o al menos 20 días. Las dosis del anticuerpo se administran, preferentemente, en intervalos de tiempo de entre 7 y 30 días, 10 y 20 días y, preferentemente, aproximadamente 14 días.

En una modalidad del método del tercer, cuarto o quinto aspecto, el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de al menos 40 µg/ml. En diferentes modalidades, el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de al menos 50 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 400 µg/ml o al menos 500 µg/ml. En diferentes modalidades, el anticuerpo se administra para proporcionar un nivel sérico de no más de 800 µg/ml, 700 µg/ml, 600 µg/ml, 550 µg/ml o 500 µg/ml. En una modalidad, el nivel sérico proporcionado está entre 40 µg/ml y 700 µg/ml, preferentemente, 40 µg/ml y 600 µg/ml, preferentemente, 50 µg/ml y 500 µg/ml, tal como entre 150 µg/ml y 500 µg/ml o 300 µg/ml y 500 µg/ml. En una modalidad, el nivel sérico se proporciona durante al menos 7 días o al menos 14 días. En una modalidad, el método comprende administrar una dosis/varias dosis del anticuerpo de al menos 300 mg/m^2 tal como al menos 600 mg/m^2 y, preferentemente, hasta 1500 mg/m^2, hasta 1200 mg/m^2 o hasta 1000 mg/m^2.

En una modalidad del método de cualquiera de los aspectos anteriores, el método comprende, además, administrar uno o más seleccionados del grupo que consiste en antieméticos, antiespasmódicos, parasimpaticolíticos y agentes que protegen la mucosa gástrica.

En un sexto aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa que comprende administrar a un paciente un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 y uno o más seleccionados del grupo que consiste en antieméticos, antiespasmódicos, parasimpaticolíticos y agentes que protegen la mucosa gástrica.

Si el método de la enseñanza comprende administrar uno o más seleccionados del grupo que consiste en antieméticos, antiespasmódicos, parasimpaticolíticos y agentes que protegen la mucosa gástrica, el método en diferentes modalidades comprende administrar: (i) un antiemético y un antiespasmódico, (ii) un antiespasmódico y un agente que protege la mucosa gástrica, (iii) un antiemético y un agente que protege la mucosa gástrica o (iv) un antiemético, un antiespasmódico y un agente que protege la mucosa gástrica.

En una modalidad, se administra un antiemético como profilaxis antiemética antes de la administración del anticuerpo. En una modalidad, se administra un antiemético como intervención antiemética simultáneamente con y/o después de la administración del anticuerpo. En una modalidad, el antiemético comprende un antagonista del receptor 5-HT3 y/o un antagonista del receptor de neuroquinina 1 (NK1). Preferentemente, el antagonista del receptor NK1 comprende Aprepitant (por ejemplo, Emend) y el antagonista del receptor 5-HT3 comprende Ondansetron (por ejemplo, Zofran), Granisetron (por ejemplo, Kytril, Sancuso) o Palonosetron (por ejemplo, Aloxi), o una combinación de dos o más de estos.

En una modalidad, el antiespasmódico comprende butilescopolamina (Buscopan).

En una modalidad, el agente que protege la mucosa gástrica comprende un agente que reduce la producción de ácido gástrico. En una modalidad, el agente que protege la mucosa gástrica comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la bomba de protones, Misoprostol y Omeprazol. En una modalidad, el agente que protege la mucosa gástrica comprende una combinación de un inhibidor de la bomba de protones y Misoprostol. En una modalidad, el inhibidor de la bomba de protones comprende Pantoprazol (por ejemplo, Pantozol).

En una modalidad, el método de la enseñanza comprende administrar al paciente un antagonista del receptor NK1 tal como Aprepitant (por ejemplo, Emend), un antagonista del receptor 5-HT3 tal como Ondansetron (por ejemplo, Zofran), Granisetron (por ejemplo, Kytril, Sancuso) o Palonosetron (por ejemplo, Aloxi), o una combinación de dos o más de estos, un antiespasmódico tal como la butilescopolamina (por ejemplo, Buscopan) y un inhibidor de la bomba de protones tal como Pantoprazol (por ejemplo, Pantozol).

En una modalidad del método de cualquiera de los aspectos anteriores, el anticuerpo se administra por infusión i.v. En una modalidad, la infusión i.v. es durante un período de tiempo de entre 1 y 4 horas, preferentemente, aproximadamente 2 horas.

En un sexto aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para determinar la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer al tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa que comprende administrar un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, dicho método comprende la etapa de determinar el nivel en sangre de uno o más marcadores en el paciente, en donde el marcador o los marcadores se seleccionan del grupo que consiste en CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IL-6, IFNγ y TNFα. En este aspecto, antes y después de la administración de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, tal como después de la administración de una dosis única del anticuerpo, pueden tomarse muestras biológicas del paciente tales como sangre para establecer el nivel del marcador o los marcadores. Pueden tomarse múltiples muestras del mismo tejido para determinar los niveles promedio y para tener en cuenta las posibles fluctuaciones en esos niveles. El nivel del marcador o los marcadores después de la administración del anticuerpo se compara con el nivel determinado antes de la administración. Por lo tanto, el efecto del anticuerpo en el paciente puede identificarse mediante un cambio deseado en el nivel del marcador después de administrar un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2. Si el paciente muestra un cambio deseado en

el nivel del marcador después de administrar un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, el tratamiento con el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 puede comenzarse.

En una modalidad, el nivel se determina en sangre, plasma o suero.

En una modalidad, el marcador o los marcadores se seleccionan del grupo que consiste en CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IFNγ y TNFα y una disminución en el nivel de al menos uno de los marcadores después de la administración del anticuerpo indica que el paciente responde al tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa.

En una modalidad, el marcador es IL-6 y un aumento en el nivel del marcador después de la administración del anticuerpo indica que el paciente responde al tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa.

En un octavo aspecto, la presente enseñanza proporciona un método para determinar si un paciente con cáncer es susceptible de tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa que comprende administrar un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, dicho método comprende la etapa de determinar el porcentaje de células cancerosas positivas para CLDN18.2.

En esta modalidad, antes de la administración de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, puede tomarse una muestra biológica tal como una muestra de tumor (por ejemplo, una biopsia de tumor) del paciente para establecer el nivel de células cancerosas positivas para CLDN18.2. Pueden tomarse múltiples muestras para determinar un nivel promedio y para tener en cuenta las posibles fluctuaciones en esos niveles. Si un paciente tiene el nivel deseado de células cancerosas positivas para CLDN18.2, puede administrarse un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2.

En una modalidad, un nivel de al menos 50 %, preferentemente, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de células cancerosas positivas para CLDN18.2 indica que el paciente es susceptible de tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa. En una modalidad, un nivel de al menos 40 %, preferentemente, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de células cancerosas que son positivas para la expresión superficial de CLDN18.2 indica que el paciente es susceptible de tratamiento o prevención de una enfermedad cancerosa.

El anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 puede unirse a epítopos nativos de CLDN18.2 presentes en la superficie de las células vivas. En una modalidad, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 se une al primer bucle extracelular de la CLDN18.2. En una modalidad, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 media la muerte celular por uno o más de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación. En una modalidad, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo. En una modalidad, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en (i) un anticuerpo producido por y/o que puede obtenerse a partir de un clon depositado con el núm. de acceso DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 o DSM ACC2810, (ii) un anticuerpo que es una forma quimérica o humanizada del anticuerpo de (i), (iii) un anticuerpo que tiene la especificidad del anticuerpo de (i) y (iv) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, del anticuerpo de (i) y preferentemente, que tiene la especificidad del anticuerpo de (i). En una modalidad, el anticuerpo se acopla a un agente terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.

En una modalidad, el cáncer es positivo para CLDN18.2. En una modalidad, las células del cáncer expresan CLDN18.2. En una modalidad, la expresión de CLDN18.2 es en la superficie de las células. En una modalidad, al menos 50 %, preferentemente, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de las células cancerosas son positivas para CLDN18.2 y/o al menos 40 %, preferentemente, al menos 50 % de las células cancerosas son positivas para la expresión superficial de CLDN18.2. En una modalidad, al menos 95 % o al menos 98 % de las células cancerosas son positivas para CLDN18.2. En una modalidad, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de las células cancerosas son positivas para la expresión superficial de CLDN18.2.

En una modalidad, la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar y las metástasis de estos. La enfermedad cancerosa puede ser un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneales y/o metástasis en los ganglios linfáticos. En una modalidad, el cáncer es un adenocarcinoma, en particular un adenocarcinoma avanzado. En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de estómago, cáncer de esófago, en particular el esófago inferior, cáncer de la unión eso-gástrica y cáncer gastroesofágico. En una modalidad preferida particularmente, el cáncer es cáncer gastroesofágico, tal como cáncer gastroesofágico avanzado metastásico, refractario o recurrente. El paciente puede ser un paciente negativo para HER2/neu o un paciente con estado positivo para HER2/neu pero no elegible para la terapia con trastuzumab. En una modalidad, el paciente recibió terapia anterior con al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en análogos de pirimidina (por ejemplo, fluorouracilo y/o capecitabina), compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino y/u oxaliplatino), epirrubicina, docetaxel y agentes detoxificantes para el tratamiento antineoplásico (por ejemplo, folinato de calcio y/o ácido folínico).

En una modalidad, el paciente tiene un estado funcional ECOG de entre 0 y 1 y/o un índice de Karnofsky de entre 70 y 100 %. En una modalidad preferida particularmente, el paciente es un paciente humano

De acuerdo con las enseñanzas descritas en la presente descripción, la CLDN18.2 tiene, preferentemente, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La presente enseñanza proporciona, además, los agentes descritos en la presente descripción, tales como el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 para su uso en los métodos descritos en la presente descripción.

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

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Concentración media en sangre de IMAB362 durante el estudio.
Figura 2. Actividad ADCC de las PBMC de pacientes. (A) Las PBMC se purificaron a partir de 6 muestras de sangre de pacientes 7 días (cuadro en blanco) o 14 días (cuadros negros) después de la administración de IMAB362. Tasas de lisis específica de células objetivo de cáncer de estómago NUGC-4, que expresan CLDN18.2, obtenidas después de la adición de 31,63 µg/ml de IMAB362 y PBMC a partir de un donante sano o PBMC de un paciente (E:T = 20:1) durante 24 h. (B) Lisis específica dependiente de la concentración de IMAB362 de células NUGC-4 obtenidas 24 h después de la adición de PBMC de pacientes diferentes (los gráficos muestran las medias ± desviación estándar, el valor p se calculó mediante el uso de la prueba t no pareada). (C) Curvas de respuesta de ADCC de las PBMC control sanas después de la adición de concentraciones crecientes de IMAB362. Los ensayos se realizaron en paralelo a cada análisis de ADCC con PBMC de pacientes. (D) Curva de respuesta de ADCC de las PBMC de pacientes tras la adición de concentraciones crecientes de IMAB362 (para el paciente 0202 no se obtuvieron suficientes PBMC para generar una curva). (E) Las tasas de mortalidad máxima media para todos los pacientes y donantes sanos se calculó con el programa informático GraphPad Prism mediante el uso de la herramienta de análisis de regresión no lineal incorporada.
Figura 3. Capacidad de los componentes del complemento del paciente para inducir CDC mediada por IMAB362. Los ensayos de CDC se realizaron con CLDN18.2 y células objetivo CHO-K1 positivas para luciferasa. Las células, el suero (20 % v/v) y los anticuerpos se incubaron durante 80 minutos a 37 °C. Las muestras de pacientes se prepararon mediante la adición de 0,5 µg/ml de IMAB362 fresco en muestras de suero de antes de la infusión (barras grises). HSC: Agrupación de suero de humano sano control con la adición de 0,3-10 µg/ml de IMAB362 (control positivo). Hi: Agrupación de suero de humano inactivado por calor con la adición de 10 µg/ml de IMAB362 (control negativo). Se indican los números de pacientes. Barras de error: ± desviación estándar
Figura 4. Capacidad de los componentes del complemento del paciente para interactuar con el IMAB362 administrado por vía i.v. en el tiempo. Los ensayos de CDC normalizados se realizaron mediante el ajuste de la concentración de IMAB362 en cada muestra a 0,5 µg/ml mediante el uso de suero anterior a la infusión de cada paciente (factor de dilución 10-680 veces). (A/B) Los ensayos de CDC se realizaron como se describió en la Figura 3. (C) Cada punto representa una medida del paciente. Cuadro en blanco: 0,5 µg/ml de IMAB362 en suero humano. Valores de P obtenidos con la prueba t pareada. Barras de error: media ± desviación estándar.
Figura 5. Cinética de citotoxicidad inducida por el IMAB362 administrado por vía i.v. Las células objetivo NUGC-4, las PBMC de un donante sano (E:T = 40:1) y las muestras de suero del paciente (25 % v/v) como anticuerpo y fuente de complemento se usaron en un ensayo de citotoxicidad total para medir la actividad citotóxica integrada. De cada paciente, se recolectaron muestras de suero 1, 7, 14 y 28-32 días después de la administración de IMAB362. Los pacientes se trataron con dosis crecientes de IMAB362 (33-1000 mg/m^2). La concentración de anticuerpos presente en el ensayo se indica más abajo de cada barra. HSC: Agrupación de suero de humano control con la adición de 200,0 µg/ml de IMAB362 fresco (EC_{80-100}). PSC: Control con suero anterior a la infusión del paciente con la adición de 200,0 µg/ml de IMAB362 fresco). n.a.: no disponible.
Figura 6. Cinética de la actividad ADCC de IMAB362 en suero de paciente inactivado por calor. El ensayo se realizó como se describió en la figura anterior, excepto que aquí el complemento del paciente se inactivó por calor (56 °C, 30 min) para separar la actividad ADCC (partes de barras negras y gris) y calcular los efectos aditivos de los componentes del suero (partes de barra blanca).
Figura 7. Actividad de CDC inducida por IMAB362 presente en el suero del paciente. Los ensayos de CDC se realizaron con CLDN18.2 y células objetivo CHO-K1 positivas para luciferasa. Estas se incubaron durante 80 minutos con suero de paciente al 20 % (v/v) obtenido 1, 7, 14 y 28-32 días después de la infusión del anticuerpo. Los pacientes se trataron con una dosis de IMAB362 de 33 a 1000 mg/m^2. La concentración de anticuerpos presente en cada ensayo se indica más abajo de cada barra. HSC: Control con agrupación de suero de humano sano con la adición de concentraciones decrecientes de IMAB362 como se indicó. PC: control positivo (suero del paciente anterior a la infusión con la adición de 10 µg/ml de IMAB362).
Figura 8. Resultados farmacocinéticos de infusiones repetidas de IMAB362 en pacientes. Media ± sd de la concentración (µg/ml) de IMAB362 en suero de 4 pacientes tratados con dosis repetidas de 300 mg/m2 (cohorte 1, figura de la izquierda) y hasta 30 pacientes (primera infusión de 30 pacientes, quinta infusión de 12 pacientes) tratados con dosis repetidas de 600 mg/m^2 (cohorte 2 y cohorte 3 juntas, figura de la derecha). Las flechas indican las infusiones de IMAB362. La primera infusión se administró el día 0.
Figura 9. Supervivencia libre de progresión de pacientes en el conjunto de análisis completo (FAS).
Figura 10. Supervivencia libre de progresión de pacientes en el conjunto por protocolo (PP) (n=20).

Descripción detallada de la invención

Aunque la presente invención se describe en detalle más abajo, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente descripción, ya que estos pueden variar. Debe entenderse, además, que la terminología usada en la presente descripción es para el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos descritos de diversas maneras y las modalidades preferidas no deben interpretarse como que limitan la presente invención a solamente las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción sustenta y abarca modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier cantidad de elementos descritos y/o preferidos. Además, cualquiera de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse descritas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera.

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

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura del campo (consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición, J. Sambrook y otros, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas aunque en algunas modalidades tal otro miembro entero, o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pueden excluirse, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de otra manera en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si se enumerara individualmente en la presente descripción. Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) que se proporciona en la presente descripción simplemente tiene el propósito de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención que se reivindica de cualquier otra manera. El lenguaje en la descripción no deberá interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

El término "CLDN18" se refiere a la claudina 18 e incluye cualquiera de las variantes, que incluye la variante de empalme 1 de la claudina 18 (claudina 18.1 (CLDN18.1)) y la variante de empalme 2 de la claudina 18 (claudina 18.2 (CLDN18.2)).

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

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

El término "variante" de acuerdo con la invención se refiere, en particular, a mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes de manera natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de una secuencia determinada de un ácido nucleico o aminoácido. El término "variante" abarcará cualquiera de las variantes modificadas postraduccionalmente y variantes conformacionales.

De acuerdo con la invención, el término "cáncer positivo para CLDN18.2" significa un cáncer que involucra células cancerosas que expresan CLDN18.2, preferentemente, en la superficie de dichas células cancerosas.

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

La CLDN18.2 se expresa en la superficie de las células si se localiza en la superficie de dichas células y es accesible a la unión mediante anticuerpos específicos para CLDN18.2 añadidos a la célula.

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

De acuerdo con la enseñanza, la CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en el tejido no canceroso distinto del estómago, preferentemente, en más de 2 veces, preferentemente, 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10 000 veces. Preferentemente, CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es suficientemente alto para permitir la unión con los anticuerpos específicos a CLDN18.2 añadidos a las células. Preferentemente, CLDN18.2 se expresa en una célula si se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, lo que incluye el cáncer, en particular, las formas de cáncer descritas en la presente descripción. Cualquier referencia en la presente descripción a cáncer o formas particulares de cáncer también incluye la metástasis del cáncer de estas. En una modalidad preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud involucra células que expresan CLDN18.2.

Las "enfermedades asociadas con células que expresan CLDN18.2" o expresiones similares significan de acuerdo con la invención que la CLDN18.2 se expresa en las células de un tejido u órgano enfermo. En una modalidad, la expresión de CLDN18.2 en células de un tejido u órgano enfermo aumenta 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 aún más. En una modalidad, 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 asociadas con células que expresan CLDN18.2 incluyen enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades cancerosas, preferentemente, son aquellas en donde las células cancerosas expresan CLDN18.2.
Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad cancerosa" o "cáncer" incluye una enfermedad que se caracteriza por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celular regulada aberrantemente. Las tres propiedades malignas de los cánceres (crecimiento incontrolado (división más allá de los límites normales), invasión (intrusión y destrucción de tejidos adyacentes) y, a veces, metástasis (propagación a otros lugares del cuerpo a través de la linfa o la sangre) diferencian los cánceres de los tumores benignos, que se autolimitan y no invaden ni hacen metástasis. La mayoría de los cánceres forman un tumor, pero algunos, como la leucemia, no lo hacen. Por "célula cancerosa" se entiende una célula anormal que crece por una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa su crecimiento después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Preferentemente, una "enfermedad cancerosa" se caracteriza por células que expresan CLDN18.2 y una célula cancerosa expresa CLDN18.2. Una célula que expresa CLDN18.2 preferentemente, es una célula cancerosa, preferentemente, de los cánceres que se describen en la presente descripción.

De acuerdo con la invención, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" se refiere a un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas, células tumorígenas o células tumorales) que forman, preferentemente, una hinchazón o lesión. Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa su crecimiento después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una pérdida parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser ya sea benigna, premaligna o maligna.

De acuerdo con la invención, un tumor es, preferentemente, un tumor maligno. "Tumor maligno" se usa como sinónimo de cáncer.

"Adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido es parte, además, de una categoría de tejido más grande conocido como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye piel, glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente a partir de ectodermo, endodermo y mesodermo. Para clasificarse como adenocarcinoma, las células no necesitan necesariamente formar parte

de una glándula, siempre que tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede producirse en algunos mamíferos superiores, lo que incluye los seres humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que se derivan, mientras que los pobremente diferenciados pueden no serlo. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza ubicua de las glándulas dentro del cuerpo. Mientras que cada glándula puede no secretar la misma sustancia, siempre que exista una función exocrina para la célula, se considera glandular y su forma maligna se denomina, por lo tanto, adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y, frecuentemente, con tiempo suficiente hacen metástasis. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometrial.

Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de las células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales del endotelio para entrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haberse transportado por la sangre, la infiltración en los órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. A menudo la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la metástasis de ganglios linfáticos. Una forma particular de metástasis que es tratable mediante el uso de la terapia de la invención es la metástasis que se origina de cáncer gástrico como sitio primario. En modalidades preferidas tal metástasis de cáncer gástrico son tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos.

El tumor de Krukenberg es un tumor metastásico infrecuente del ovario que representa del 1 % al 2 % de todos los tumores ováricos. El pronóstico del tumor de Krukenberg es todavía muy pobre y no hay tratamiento establecido para los tumores de Krukenberg. El tumor de Krukenberg es un adenocarcinoma del ovario metástasico de las células en anillo de sello. El estómago es el sitio primario en la mayoría de los casos del tumor de Krukenberg (70 %). Los carcinomas de colon, apéndice, y mama (principalmente el carcinoma lobular invasivo) son los sitios primarios siguientes más comunes. Se han reportado casos raros del tumor de Krukenberg que se originan de carcinomas de la vesícula biliar, el tracto biliar, el páncreas, el intestino delgado, la ampolla de Vater, la cerviz, y la vejiga urinaria/uraco.

Las mujeres con tumores de Krukenberg tienden a ser inusualmente jóvenes para pacientes con carcinoma metastásico, ya que generalmente se encuentran en la quinta década de sus vidas, con una edad promedio de 45 años. Esta edad temprana de distribución puede relacionarse en parte con la frecuencia aumentada de carcinomas de células en anillo de sello gástrico en mujeres jóvenes. Los síntomas presentes comúnmente se relacionan generalmente con afecciones ováricas, la más común de las cuales es el dolor abdominal y la distensión (principalmente debido a las masas ováricas generalmente bilaterales y a menudo grandes). Los pacientes restantes tienen síntomas gastrointestinales inespecíficos o son asintomáticos. Además, el tumor de Krukenberg se informa que se asocia con la virilización resultante de la producción de hormonas por el estroma ovárico. Se presenta ascitis en el 50 % de los casos y generalmente revela células malignas.

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

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

Por "tratar" se entiende administrar un compuesto o composición o una combinación de compuestos o composiciones a un sujeto para prevenir o eliminar una enfermedad, lo que incluye reducir el tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; detener o retrasar una enfermedad en un sujeto; inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o la gravedad de los síntomas y/o de las recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que ha tenido previamente una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la duración de la vida del sujeto.

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

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

De acuerdo con la invención, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 puede administrarse en combinación con, es decir, simultáneamente con, seguido de y/o después, un agente que estabiliza o aumenta la expresión de la CLDN18.2.

El término "agente estabilizador o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" se refiere a un agente o una combinación de agentes cuya provisión a las células resulta en niveles aumentados de ARN y/o proteína de CLDN18.2, preferentemente, en niveles aumentados de proteína CLDN18.2 en la superficie celular, en comparación con la situación donde a las células no se les proporciona el agente o la combinación de agentes. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, en particular una célula cancerosa que expresa CLDN18.2, tal como una célula de los tipos de cáncer descritos en la presente descripción. El término "agente que estabiliza o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" se refiere, en particular, a un agente o una combinación de agentes cuya provisión a las células resulta en una densidad mayor de CLDN18.2 en la superficie de dichas células en comparación con la situación donde a las células no se les proporciona el agente o la combinación de agentes. "Expresión estabilizada de la CLDN18.2" incluye, en particular, la situación donde el agente o la combinación de agentes impide una disminución o reduce una disminución en la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 disminuiría sin la provisión del agente o la combinación de agentes y la provisión del agente o la combinación de agentes evita dicha disminución o reduce dicha disminución de la expresión de la CLDN18.2. "Expresión aumentada de la CLDN18.2" incluye, en particular, la situación donde el agente o la combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 disminuiría, permanecería esencialmente constante o aumentaría sin la provisión del agente o la combinación de agentes y la provisión del agente o la combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18.2 en comparación con la situación sin la provisión del agente o la combinación de agentes para que la expresión resultante sea mayor en comparación con la situación donde la expresión de CLDN18.2 disminuiría, permanecería esencialmente constante o aumentaría sin la provisión del agente o la combinación de agentes.

De acuerdo con la invención, el término "agente que estabiliza o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" incluye agentes quimioterapéuticos o combinaciones de agentes quimioterapéuticos tales como agentes citostáticos. Los agentes quimioterapéuticos pueden afectar las células de una de las maneras siguientes: (1) Dañar el ADN de las células para que ya no puedan reproducirse, (2) Inhibir la síntesis de nuevas cadenas de ADN para que no sea posible la replicación celular, (3) Detener los procesos mitóticos de las células para que las células no puedan dividirse en dos células.

De acuerdo con la invención, el término "agente que estabiliza o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" se refiere, preferentemente, a un agente o una combinación de agentes tales como un compuesto citostático o una combinación de compuestos citostáticos cuya provisión a las células, en particular células cancerosas, resulta en que las células se detienen o se acumulan en una o más fases del ciclo celular, preferentemente, en una o más fases del ciclo celular que no sean las fases G1 y G0, preferentemente, que no sean la fase G1, preferentemente, en una o más de la fase G2 o S del ciclo celular tal como la fase G1/G2, S/G2, G2 o S del ciclo celular. El término "células que se detienen o se acumulan en una o más fases del ciclo celular" significa que aumenta el porcentaje de células que se encuentran en dichas una o más fases del ciclo celular. Cada célula pasa a través de un ciclo que comprende cuatro fases para replicarse. La primera fase llamada G1 es cuando la célula se prepara para replicar sus cromosomas. La segunda etapa se denomina S, y en esta fase se produce la síntesis de ADN y el ADN se duplica. La fase siguiente es la fase G2, cuando el ARN y la proteína se duplican. La etapa final es la etapa M, que es la etapa de la división celular real. En esta etapa final, el ADN y el ARN duplicados se dividen y se mueven a extremos separados de la célula, y la célula se divide realmente en dos células funcionales idénticas. Los agentes quimioterapéuticos que son agentes que dañan el ADN generalmente provocan una acumulación de células en la fase G1 y/o G2. Los agentes quimioterapéuticos que bloquean el crecimiento celular al interferir con la síntesis de ADN, tales como los antimetabolitos, provocan generalmente una acumulación de células en la fase S. Ejemplos de estos fármacos son la 6-mercaptopurina y el 5-fluorouracilo.

De acuerdo con la invención, el término "agente que estabiliza o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" incluye antraciclinas tales como epirrubicina, compuestos de platino tales como oxaliplatino y cisplatino, análogos de nucleósidos tales como 5-fluorouracilo o profármacos de estos, taxanos tales como docetaxel y camptotecina, análogos tales como como irinotecano y topotecano y combinaciones de fármacos tales como combinaciones de fármacos que comprenden una o más de antraciclinas tales como epirrubicina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo tales como una combinación de fármacos que comprenden oxaliplatino y 5-fluorouracilo u otras combinaciones de fármacos descritas en la presente descripción. En una modalidad preferida, un "agente que estabiliza o que aumenta la expresión de la CLDN18.2" es un "agente que induce la muerte celular inmunogénica".

En circunstancias específicas, las células cancerosas pueden entrar en una vía de estrés letal vinculada a la emisión de una combinación de señales definidas espaciotemporalmente que se decodifican por el sistema inmunitario para activar respuestas inmunitarias específicas de tumor (Zitvogel L. y otros (2010) Cell 140: 798-804). En dicho escenario, las células cancerosas se activan para emitir señales que se detectan por efectores inmunitarios innatos, tales como las células dendríticas, para desencadenar una respuesta inmunitaria relacionada que involucra a las células T CD8+ y la

señalización de IFN-γ, de modo que la muerte de las células tumorales pueda provocar una respuesta inmunitaria contra el cáncer productiva. Estas señales incluyen la exposición preapoptótica de la calreticulina chaperona (CRT) del retículo endoplásmico (ER) en la superficie celular, la secreción preapoptótica de ATP y la liberación postapoptótica de la proteína nuclear HMGB1. Juntos, estos procesos constituyen los determinantes moleculares de la muerte celular inmunogénica (ICD). Las antraciclinas, el oxaliplatino y la irradiación γ son capaces de inducir todas las señales que definen la ICD, mientras que el cisplatino, por ejemplo, que es deficiente en la inducción de la translocación de CRT del ER a la superficie de las células moribundas, un proceso que requiere estrés del ER, requiere la complementación con tapsigargina, un inductor de estrés del ER.

De acuerdo con la invención, el término "agente que induce la muerte celular inmunogénica" se refiere a un agente o una combinación de agentes que cuando se proporciona a las células, en particular a las células cancerosas, es capaz de inducir a las células a entrar en una vía de estrés letal que finalmente resulta en respuestas inmunitarias específicas de tumor. En particular, un agente que induce la muerte celular inmunogénica cuando se proporciona a las células induce a las células a emitir una combinación de señales definidas espaciotemporalmente, lo que incluye, en particular, la exposición preapoptótica de la calreticulina chaperona (CRT) del retículo endoplásmico (ER) en la superficie celular, la secreción preapoptótica de ATP y la liberación postapoptótica de la proteína nuclear HMGB1.

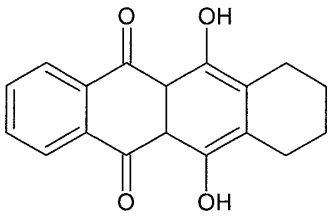
De acuerdo con la invención, el término "agente que induce la muerte celular inmunogénica" incluye las antraciclinas y el oxaliplatino.

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

Las antraciclinas, preferentemente, producen uno o más de los mecanismos de acción siguientes: 1. Inhibir la síntesis de ADN y ARN al intercalarse entre pares de bases de la cadena de ADN/ARN, y evitar de esta forma la replicación de células cancerosas de rápido crecimiento. 2. Inhibir la enzima topoisomerasa II, lo que impide la relajación del ADN superenrollado y, por lo tanto, bloquea la transcripción y replicación del ADN. 3. Crear radicales libres de oxígeno mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares.

De acuerdo con la invención, el término "antraciclina" se refiere, preferentemente, a un agente, preferentemente, un agente contra el cáncer para inducir apoptosis, preferentemente, mediante la inhibición de la reconexión del ADN en la topoisomerasa II.

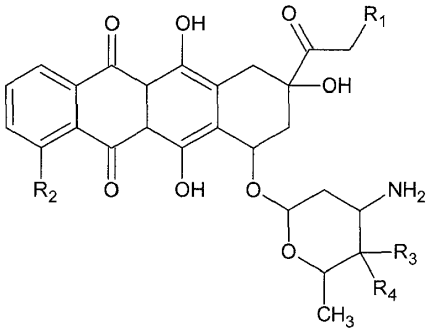
Preferentemente, de acuerdo con la invención, el término "antraciclina" se refiere generalmente a una clase de compuestos que tienen la estructura de anillo siguiente



lo que incluye análogos y derivados, sales farmacéuticas, hidratos, ésteres, conjugados y profármacos de estos.

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

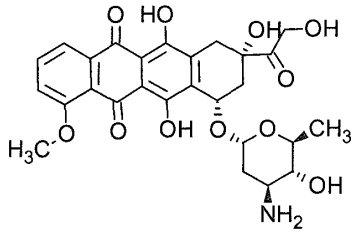
Particularmente preferida como antracilina de acuerdo con la invención es un compuesto de la fórmula siguiente:



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

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

La epirrubicina se contempla específicamente como antraciclina en el contexto de la presente invención. La epirrubicina es un fármaco de antraciclina que tiene la fórmula siguiente:

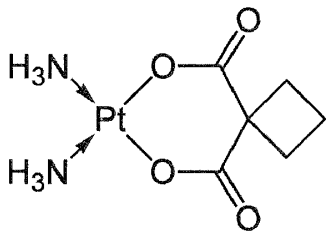


y se comercializa con el nombre comercial Ellence en los Estados Unidos y Pharmorubicin o Epirubicin Ebewe en otros lugares. En particular, el término "epirrubicina" se refiere al compuesto (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metil-oxan-2-il]oxi-6,11-dihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-8-metil-9,10-dihidro-7H-tetracen-5,12-diona.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

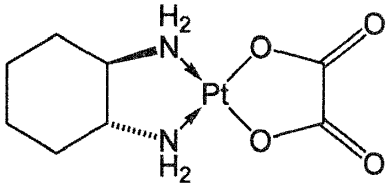
De acuerdo con la invención, el término "compuesto de platino" se refiere a compuestos que contienen platino en su estructura, tales como complejos de platino e incluye compuestos tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

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

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



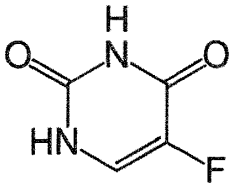
El término "oxaliplatino" se refiere a un compuesto que es un compuesto de platino que forma un complejo con un ligando portador de diaminociclohexano de la fórmula siguiente:



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

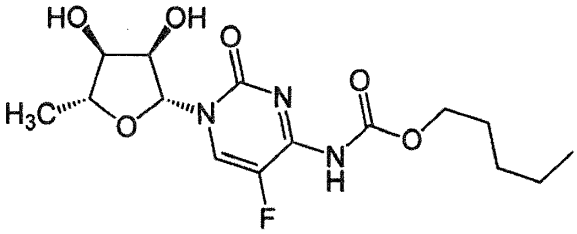
El término "análogo de nucleósido" se refiere a un análogo estructural de un nucleósido, una categoría que incluye tanto análogos de purina como análogos de pirimidina. En particular, el término "análogo de nucleósido" se refiere a derivados de fluoropirimidina que incluyen fluorouracilo y profármacos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

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



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

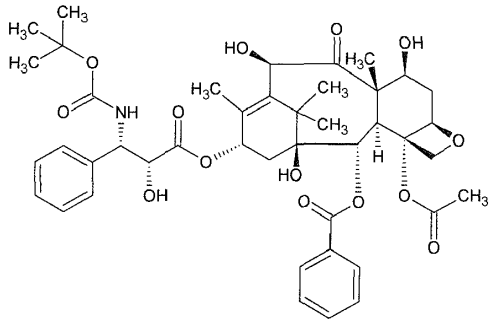
El término "capecitabina" (Xeloda, Roche) se refiere a un agente quimioterapéutico que es un profármaco que se convierte en 5-FU en los tejidos. La capecitabina que puede administrarse por vía oral tiene la fórmula siguiente:



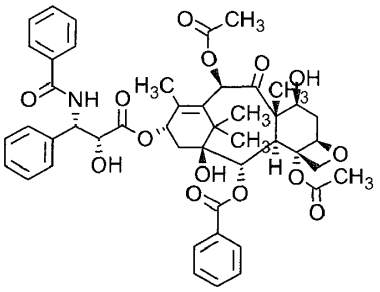
En particular, el término se refiere al compuesto pentil [1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofurano-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbamato.

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

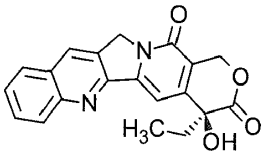
De acuerdo con la invención, el término "docetaxel" se refiere a un compuesto que tiene la fórmula siguiente:



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

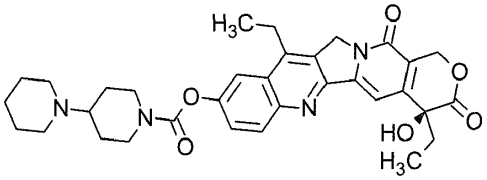


De acuerdo con la invención, el término "análogo de camptotecina" se refiere a derivados del compuesto camptotecina (CPT; (S)-4-etil-4-hidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-3,14-(4H,12H)-diona). Preferentemente, el término "análogo de camptotecina" se refiere a compuestos que comprenden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



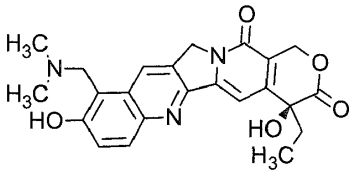
De acuerdo con la invención, los análogos de camptotecina preferidos son inhibidores de la enzima ADN topoisomerasa I (topo I). Los análogos de camptotecina preferidos de acuerdo con la invención son irinotecano y topotecano.

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



En particular, el término "irinotecano" se refiere al compuesto (S)-4,11-dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-9-il-[1,4'-bipiperidin]-1'-carboxilato.

El topotecano es un inhibidor de la topoisomerasa de la fórmula:



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

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

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

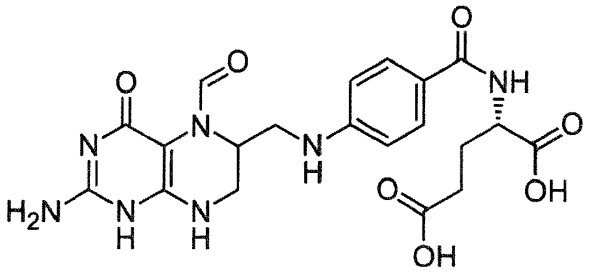
La epirrubicina se administra normalmente a una dosis de 50 mg/m2, cisplatino 60 mg/m2, oxaliplatino 130 mg/m2, infusión venosa prolongada de 5-fluorouracilo a 200 mg/m2/día y capecitabina oral 625 mg/m2 dos veces al día, para un total de ocho ciclos de 3 semanas.

La combinación de fármacos usada en la quimioterapia con FLO comprende 5-fluorouracilo, ácido folínico y oxaliplatino (normalmente infusión de 24 h de 5-fluorouracilo 2600 mg/m2, ácido folínico 200 mg/m2 y oxaliplatino 85 mg/m2, cada 2 semanas).

FOLFOX es un régimen de quimioterapia compuesto de ácido folínico (leucovorina), 5-fluorouracilo y oxaliplatino. El esquema de dosis recomendado que se administra cada dos semanas es el siguiente: Día 1: Infusión i.v. de oxaliplatino 85 mg/m^2 e infusión i.v. de leucovorina 200 mg/m^2, seguida de bolo i.v. de 5-FU 400 mg/m^2, seguido de infusión i.v. de 5-FU 600 mg/m^2 como una infusión continua de 22 horas; Día 2: Infusión i.v. de Leucovorina 200 mg/m^2 durante 120 minutos, seguida de bolo i.v. de 5-FU 400 mg/m^2 administrado durante 2-4 minutos, seguido de infusión i.v. de 5-FU 600 mg/m^2 como una infusión continua de 22 horas.

La combinación de fármacos usada en la quimioterapia FOLFIRI se compone de 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecano.
La combinación de fármacos usada en la quimioterapia con DCF se compone de docetaxel, cisplatino y 5-fluorouracilo.
La combinación de fármacos usada en la quimioterapia FLOT se compone de docetaxel, oxaliplatino, 5-fluorouracilo y ácido folínico.

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



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

De acuerdo con la invención, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 puede administrarse en combinación con, es decir, simultáneamente con, seguido de y/o después, un agente que estimula las células T γδ.

Las células T γδ (células T gamma delta) representan un pequeño subconjunto de células T que poseen un receptor distintivo de células T (TCR) en su superficie. La mayoría de las células T tienen un TCR compuesto por dos cadenas de glucoproteína llamadas cadenas α y β de TCR. Por el contrario, en las células T γδ, el TCR se forma por una cadena γ y una cadena δ. Este grupo de células T generalmente es mucho menos común que las células T αβ. Las células T γδ humanas juegan un papel importante en las respuestas de vigilancia del estrés, como las enfermedades infecciosas y la autoinmunidad. Además, se sugiere que los cambios inducidos por la transformación en los tumores provocan respuestas de vigilancia del estrés mediadas por células T γδ y mejoran la inmunidad antitumoral. Es importante destacar que, después del acoplamiento con el antígeno, las células T γδ activadas en los sitios de lesión proporcionan citocinas (por ejemplo, INFγ, TNFα) y/o quimiocinas que median el reclutamiento de otras células efectoras y muestran funciones efectoras inmediatas tales como la citotoxicidad (a través de receptores de muerte y vías de gránulos citolíticos) y ADCC.

La mayoría de las células T γδ en sangre periférica expresan el receptor de células T Vγ9Vδ2 (TCRγδ). Las células T Vγ9Vδ2 son exclusivas de los humanos y los primates y se supone que juegan un papel temprano y esencial en la detección del "peligro" al invadir los patógenos, ya que se expanden dramáticamente en muchas infecciones agudas y pueden exceder a todos los demás linfocitos dentro de pocos días, por ejemplo, en la tuberculosis, salmonelosis, ehrlichiosis, brucelosis, tularemia, listeriosis, toxoplasmosis y malaria.

Las células T γδ responden a pequeños antígenos fosforilados no peptídicos (fosfoantígenos) tales como los pirofosfatos sintetizados en bacterias y el pirofosfato de isopentenilo (IPP) producido en células de mamíferos a través de la vía del mevalonato. Mientras que la producción de IPP en células normales no es suficiente para la activación de las células T γδ, la desregulación de la vía del mevalonato en las células tumorales conduce a la acumulación de IPP y a la activación de las células T γδ. Los IPP también pueden aumentarse terapéuticamente mediante aminobisfosfonatos, que inhiben la enzima de la vía del mevalonato, farnesil pirofosfato sintasa (FPPS). Entre otros, el ácido zoledrónico (ZA, zoledronato, Zometa™, Novartis) representa dicho aminobisfosfonato, que ya se administra clínicamente a pacientes para el tratamiento de osteoporosis y enfermedad ósea metastásica. Después del tratamiento de las PBMC *in vitro,* el ZA se absorbe especialmente por los monocitos. El IPP se acumula en los monocitos y estos se diferencian en células presentadoras de antígeno lo que estimula el desarrollo de las células T γδ. En este contexto, se prefiere la adición de interleucina-2 (IL-2) como factor de crecimiento y supervivencia para las células T γδ activadas. Finalmente, se han descrito ciertas aminas alquiladas para activar las células T Vγ9Vδ2 in vitro, sin embargo solo a concentraciones milimolares.

De acuerdo con la invención, el término "agente que estimula las células T γδ" se refiere a compuestos que estimulan el desarrollo de las células T γδ, en particular las células T Vγ9Vδ2, in vitro y/o in vivo, en particular al inducir la activación y expansión de las células T γδ. Preferentemente, el término se refiere a compuestos que aumentan in vitro y/o in vivo el pirofosfato de isopentenilo (IPP) producido en células de mamífero, preferentemente, al inhibir la enzima de la vía del mevalonato, farnesil pirofosfato sintasa (FPPS).

Un grupo particular de compuestos que estimulan las células T γδ son los bisfosfonatos, en particular los bisfosfonatos que contienen nitrógeno (N-bisfosfonatos; aminobisfosfonatos).

Por ejemplo, los bisfosfonatos adecuados para su uso en la invención pueden incluir uno o más de los compuestos siguientes, lo que incluye los análogos y derivados, sales farmacéuticas, hidratos, ésteres, conjugados y profármacos de estos:

ácido [1-hidroxi-2-(1H-imidazol-1-il)etano-1,1-diil]bis(fosfónico), ácido zoledrónico, por ejemplo, zoledronato;
ácido (dicloro-fosfono-metil)fosfónico, por ejemplo, clodronato
ácido {1-hidroxi-3-[metil(pentil)amino]propano-1,1-diil}bis(fosfónico), ácido ibandrónico, por ejemplo, ibandronato
ácido (3-amino-1-hidroxipropano-1,1-diil)bis (fosfónico), ácido pamidrónico, por ejemplo, pamidronato;
ácido (1-hidroxi-1-fosfono-2-piridin-3-il-etil)fosfónico, ácido risedrónico, por ejemplo risedronato;
ácido (1-hidroxi-2-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-1-fosfonoetil)fosfónico, ácido minodrónico;
ácido [3-(dimetilamino)-1-hidroxipropano-1,1-diil]bis(fosfónico), ácido olpadrónico.
ácido [4-amino-1-hidroxi-1-(hidroxi-oxido-fosforil)-butil]fosfónico, ácido alendrónico, por ejemplo alendronato;
ácido [(cicloheptilamino)metilen]bis(fosfónico), ácido incadrónico;
ácido (1-hidroxietano-1,1-diil)bis(fosfónico), ácido etidrónico, por ejemplo, etidronato; y
ácido {[(4-clorofenil)tio]metilen}bis(fosfónico), ácido tiludrónico.

De acuerdo con la invención, el ácido zoledrónico (INN) o zoledronato (comercializado por Novartis con los nombres comerciales Zometa, Zomera, Aclasta y Reclast) es un bisfosfonato preferido particularmente. Zometa se usa para prevenir fracturas esqueléticas en pacientes con cánceres tales como mieloma múltiple y cáncer de próstata, así como también para el tratamiento de la osteoporosis. Además, puede usarse para tratar la hipercalcemia de tumores malignos y puede ser útil para tratar el dolor de las metástasis óseas.

En una modalidad preferida particularmente, un agente que estimula las células T γδ de acuerdo con la invención se administra en combinación con la IL-2. Dicha combinación ha demostrado ser eficaz particularmente en mediar la expansión y activación de las células T γ9δ2.

La interleucina-2 (IL-2) es una interleucina, un tipo de molécula de señalización de citocina en el sistema inmunitario. Es una proteína que atrae linfocitos y es parte de la respuesta natural del cuerpo a la infección microbiana, y en la discriminación entre extraño (no propio) y propio. La IL-2 media sus efectos al unirse a los receptores de IL-2, que se expresan por los linfocitos.

La IL-2 usada de acuerdo con la invención puede ser cualquier IL-2 que soporte o permita la estimulación de las células T γδ y puede derivarse de cualquier especie, preferentemente, de humanos. La IL-2 puede ser IL-2 aislada, producida de forma recombinante o sintética y puede ser IL-2 natural o modificada.

De acuerdo con la invención, el término "antiemético" se refiere a un compuesto, composición o fármaco que es eficaz contra el vómito y/o las náuseas. En una modalidad, el antiemético incluye un antagonista del receptor 5-HT3 y/o un antagonista del receptor de neuroquinina 1 (NK1).

Los antagonistas del receptor 5-HT3 bloquean los receptores de serotonina en el sistema nervioso central y el tracto gastrointestinal. Los ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, Ondansetron (Zofran) que puede administrarse en forma de comprimido oral, comprimido de disolución oral, o en una inyección, Dolasetron (Anzemet) que puede administrarse en forma de comprimido o inyección, Granisetron (Kytril, Sancuso) que puede administrarse en comprimidos (Kytril), solución oral (Kytril), inyección (Kytril) o en un parche transdérmico único en la parte superior del brazo (Sancuso), Tropisetron (Navoban) que puede administrarse en cápsulas orales o en forma de inyección, Palonosetron (Aloxi) que puede administrarse en una inyección o en cápsulas orales y Mirtazapina (Remeron).

Los antagonistas del receptor NK1 incluyen, pero no se limitan a, Aprepitant (Emend).

Una combinación preferida de un antagonista del receptor 5-HT3 y un antagonista del receptor NK1 es una combinación de Ondansetron (Zofran) y Aprepitant (Emend).

Otros antieméticos que pueden usarse de acuerdo con la invención, en particular en combinación con un antagonista del receptor 5-HT3 y/o un antagonista del receptor NK1 incluyen, pero no se limitan a, metoclopramida (Reglan) que actúa en el tracto gastrointestinal como un procinético, Lorazepam, Atropina, Alizaprida (Litican, Plitican, Superan, Vergentan) y Dimenhidrinato (Dramamine, Driminate, Gravol, Gravamin, Vomex, Vertirosan).

De acuerdo con la invención, puede administrarse un antiespasmódico (sinónimo: espasmolítico). De acuerdo con la invención, el término "antiespasmódico" se refiere a un compuesto, composición o fármaco que suprime los espasmos musculares. Preferentemente, un antiespasmódico es útil para la contracción del músculo liso. De acuerdo con la invención, se prefieren los antiespasmódicos que son eficaces en el tratamiento de la actividad espasmódica en el sistema digestivo. Por lo tanto, los antiespasmódicos preferidos son eficaces en el alivio de los espasmos gastrointestinales.

Los antiespasmódicos incluyen, pero no se limitan a, butilescopolamina, que también se conoce como butilbromuro de escopolamina, butilhioscina y butilbromuro de hioscina. Se comercializa con el nombre comercial Buscopan por Boehringer Ingelheim GmbH, Alemania.

De acuerdo con la invención, puede administrarse un parasimpaticolítico. De acuerdo con la invención, el término "parasimpaticolítico" se refiere a un compuesto, composición o fármaco que reduce la actividad del sistema nervioso parasimpático. Los parasimpaticolíticos incluyen, pero no se limitan a, Atropina.

De acuerdo con la invención, el término "inhibidor de la bomba de protones" se refiere a un compuesto, composición o fármaco cuya acción principal es una reducción pronunciada y duradera de la producción de ácido gástrico.

Los inhibidores de la bomba de protones incluyen derivados de bencimidazol y derivados de imidazopiridina. Los ejemplos de inhibidores de la bomba de protones incluyen, pero no se limitan a, Omeprazol (nombres de marca: Gasec, Losec, Prilosec, Zegerid, ocid, Lomac, Omepral, Omez,), Lansoprazol (nombres de marca: Prevacid, Zoton, Monolitum, Inhibitol, Levant, Lupizole), Dexlansoprazol (nombre de marca: Kapidex, Dexilant), Esomeprazol (nombres de marca: Nexium, Esotrex, esso), Pantoprazol (nombres de marca: Protonix, Somac, Pantoloc, Pantozol, Zurcal, Zentro, Pan, Controloc, Tecta), Rabeprazol (nombres de marca: AcipHex, Pariet, Erraz, Zechin, Rabecid, Nzole-D, Rabeloc, Razo) e Ilaprazol (nombres de marca: Ilapro, Lupilla, Adiza).

De acuerdo con la invención, pueden administrarse otros compuestos, composiciones o fármacos que tienen un efecto protector sobre la mucosa gástrica, en particular si se administra un fármaco antiinflamatorio no esteroidal (NSAID).

Por ejemplo, pueden administrarse otros compuestos, composiciones o fármacos para impedir el efecto adverso común de la ulceración gástrica de los NSAID, en particular para prevenir las úlceras gástricas inducidas por NSAID. En una modalidad, puede administrarse Misoprostol, que es un análogo sintético de la prostaglandina E1 (PGE1) que se usa para la prevención de úlceras gástricas inducidas por NSAID. El misoprostol actúa sobre las células parietales gástricas, al inhibir la secreción de ácido gástrico a través de la inhibición, mediada por el receptor acoplado a la proteína G, de la adenilato ciclasa, lo que conduce a una disminución de los niveles de AMP cíclico intracelular y una disminución de la actividad de la bomba de protones en la superficie apical de la célula parietal.

Además, el Omeprazol demostró ser al menos tan eficaz como el misoprostol en el tratamiento de las úlceras inducidas por NSAID, pero se toleró mejor significativamente.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroidales (NSAID) son una clase de fármacos que proporcionan efectos analgésicos y antipiréticos (reductores de la fiebre) y, en dosis más altas, efectos antiinflamatorios. El término "no esteroidal" distingue estos medicamentos de los esteroides. Los miembros más destacados de este grupo de fármacos son la aspirina, el ibuprofeno y el naproxeno.

Una de las principales reacciones adversas a los medicamentos (ADR) asociadas con los NSAID se relaciona con los efectos gastrointestinales (GI) de los NSAID. Estos efectos son, en muchos casos, lo suficientemente graves como para presentar el riesgo de perforación de la úlcera y sangrado gastrointestinal superior. Los pacientes con NSAID experimentan dispepsia, eventos adversos gastrointestinales superiores asociados con NSAID, irritación del tracto gastrointestinal (GI) y ulceración GI. Los NSAID provocan un doble ataque en el tracto gastrointestinal: las moléculas ácidas irritan directamente la mucosa gástrica, y la inhibición de COX-1 y COX-2 reduce los niveles de prostaglandinas protectoras. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el tracto gastrointestinal provoca un aumento de la secreción de ácido gástrico, disminución de la secreción de bicarbonato, disminución de la secreción de moco y disminución de los efectos tróficos sobre la mucosa epitelial. Por lo tanto, los NSAID, preferentemente, no se administran de acuerdo con la invención. El paracetamol o "acetaminofén" que no se clasifica como NSAID porque solo ejerce efectos antiinflamatorios débiles puede administrarse como analgésico de acuerdo con la invención, sin embargo, puede no ser eficaz para el tratamiento del dolor y, por lo tanto, la administración de un NSAID podría volverse necesaria, en particular para evitar la administración de opiáceos.

Comúnmente, los efectos adversos gástricos (pero no necesariamente intestinales) pueden reducirse mediante la supresión de la producción de ácido, mediante el uso concomitante de un inhibidor de la bomba de protones, por ejemplo, Omeprazol, Esomeprazol; o el análogo de prostaglandina Misoprostol.

El término "antígeno" se refiere a un agente tal como una proteína o péptido que comprende un epítopo contra el cual se direcciona y/o es para direccionar una respuesta inmunitaria. En una modalidad preferida, un antígeno es un antígeno asociado a tumor, tal como CLDN18.2, es decir, un constituyente de células cancerosas que puede derivarse del

citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferentemente, en gran cantidad, intracelular o como antígenos de superficie en células cancerosas.

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno asociado a tumor" se refiere, preferentemente, a proteínas que en condiciones normales se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/o órganos o en etapas específicas del desarrollo y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tumores o tejidos cancerosos. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia preferentemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferentemente, no se expresa o solo se expresa rara vez en tejidos normales.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que se reconoce por el sistema inmunitario, por ejemplo, que se reconoce por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítopos son los sitios discretos, tridimensionales en un antígeno, que se reconocen por el sistema inmunitario. Los epítopos usualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen usualmente características específicas de estructura tridimensional, así como también características específicas de carga. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítopo de una proteína tal como la CLDN18.2 comprende, preferentemente, una porción continua o discontinua de dicha proteína y está, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente, entre 5 y 50, con mayor preferencia, entre 8 y 30, con la máxima preferencia, entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítopo puede tener, preferentemente, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que se interconectan por enlaces disulfuro, e incluye cualquier molécula que comprende una porción de unión a antígeno de este. El término "anticuerpo" incluye los anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de estos, que incluyen, sin limitación, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, scFv y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno tales como fragmentos Fab y Fab' e incluye, además, todas las formas recombinantes de los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos que se expresan en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquiera de los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y derivados como se describen en la presente descripción. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras 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 del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y al primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

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

El término "anticuerpo 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 donde la estructura remanente de la inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender tanto dominios variables completos fusionados a dominios constantes como solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en las 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 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 donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento remanente de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada mimetiza las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas mediante el uso de células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos huéspedes no humanos en combinación con las

regiones constantes que se derivan de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar y que la fuente no afecta a la especificidad, la región constante que es humana, es menos probable que genere una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que si la región constante fuera 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") o términos similares, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por los 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 de los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten de los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten de un dominio VH; (vi) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aisladas y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar unidas opcionalmente por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, ellos pueden unirse, mediante el uso de métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite hacerlo como una proteína de monocatenaria en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatanaria (scFv); ver por ejemplo, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena única se abarquen dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona a un polipéptido de la región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen además en los documentos núms. US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante el uso de técnicas convencionales que conocen los expertos en la técnica, y se seleccionan los fragmentos para la utilidad de la misma manera que a los anticuerpos intactos.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. En consecuencia, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, triespecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a la CLDN18.2, y a otros objetivos, tales como receptores de Fc en las células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" incluye, además, diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan sobre una cadena polipeptídica única, pero mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo cual fuerza, de esta manera, a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., y otros (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y otros (1994) Structure 2: 1121-1123).

Un anticuerpo puede conjugarse a un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial a y, en particular, mate a las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar anticuerpos conjugados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una modalidad que se prefiere, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra modalidad más, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad que se prefiere, el agente terapéutico es doxorrubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

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

Los anticuerpos conjugados de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada y el resto del fármaco no debe interpretarse como limitada para agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

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

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

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

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ser anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión y afinidad únicas. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B que se obtiene de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que se fusiona a una célula inmortalizada.

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

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobayo y humano.

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

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

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante que corresponde a la que se encuentra en un organismo que no es el organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta a la del organismo transgénico.

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes organismos de origen. 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 anticuerpo como se describen en la presente descripción los que para los fines de la invención se encuentran abarcados dentro del término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpos" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción son, preferentemente, aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN18.2, está esencialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN18.2). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo, isoforma o variante de CLDN18.2 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de CLDN18.2). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a los anticuerpos que tienen especificidades diferentes y que se combinan en una composición o mezcla bien definida.

El término "unión" de acuerdo con la invención, se refiere preferentemente a una unión específica.

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 en equilibrio (K_D). Preferentemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9}M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un anticuerpo no es (sustancialmente) capaz 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 manera detectable a dicho objetivo en ensayos estándar. Preferentemente, el anticuerpo no se une de manera detectable a dicho objetivo si está presente en una concentración de hasta 2, preferentemente 10, con mayor preferencia 20, en particular 50 o 100 µg/ml o superior. Preferentemente, un anticuerpo no tiene afinidad significativa por un objetivo si se une a dicho objetivo con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3-veces, 10^4-veces, 10^5-veces, o 10^6-veces mayor que la K_D para unirse al objetivo predeterminado al cual el anticuerpo es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un anticuerpo al objetivo al cual el anticuerpo es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D para unirse a un objetivo para el cual el anticuerpo no tiene afinidad significativa sería de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

Un anticuerpo es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado a la vez que no es capaz de unirse a otros objetivos, es decir, no tiene afinidad significativa por otros objetivos y no se une significativamente a otros objetivos en ensayos estándar. De acuerdo con la invención, un anticuerpo es específico para la CLDN18.2 si es capaz de unirse a la CLDN18.2 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos. Preferentemente, un agente es específico para la CLDN18.2 si la afinidad por y la unión a dichos otros objetivos no excede significativamente la afinidad por o la unión a proteínas no relacionadas con la CLDN18.2 tales como albúmina de suero bovino (BSA), caseína, albúmina de suero humano (HSA) o proteínas transmembrana que no son claudinas, tales como moléculas del MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un agente 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 menor que la K_D de unión a un objetivo para la que no es específico. Por ejemplo, si la K_D de unión de un anticuerpo al objetivo para la que es específico es 10^{-7} M, la K_D de unión a un objetivo para la que no es específico pudiera ser 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 mediante el uso de cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky y otros, "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman y Company Nueva York, N Y (1992), y los métodos que se describen en la presente descripción. Las afinidades pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, tales como la diálisis de equilibrio; mediante el uso del instrumento BIAcore 2000, mediante el uso de procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo mediante el uso del antígeno objetivo radiomarcado; o por otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard y otros, Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949). La afinidad que se mide a una interacción particular antígeno anticuerpo puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D, IC_{50}, se llevan a cabo preferentemente, con las soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

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

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

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

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

De acuerdo con la invención, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es un anticuerpo capaz de unirse a un epítopo presente en la CLDN18.2, preferentemente, un epítopo que se localiza dentro de los dominios extracelulares de la CLDN18.2, en particular el primer dominio extracelular, preferentemente, las posiciones de los aminoácidos 29 a 78 de CLDN18.2. En modalidades particulares, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es un anticuerpo capaz de unirse a (i) un epítopo en la CLDN18.2 que no está presente en la CLDN18.1, preferentemente, SEQ ID NO: 3, 4 y 5, (ii) un epítopo localizado en el bucle 1 de la CLDN18.2, preferentemente, SEQ ID NO: 8, (iii) un epítopo localizado en el bucle 2 de la CLDN18.2, preferentemente, SEQ ID NO: 10, (iv) un epítopo localizado en el bucle D3 de la CLDN18.2, preferentemente, SEQ ID NO: 11, (v) un epítopo, que abarca el bucle 1 de la CLDN18.2 y el bucle D3 de la CLDN18.2, o (vi) un epítopo no glicosilado localizado en el bucle D3 de la CLDN18.2, preferentemente, SEQ ID NO: 9. De acuerdo con la invención, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es, preferentemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 pero no a la CLDN18.1. Preferentemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es específico para la CLDN18.2. Preferentemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2, preferentemente, es un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 expresada en la superficie celular. En modalidades particulares preferidas, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 se une a epítopos nativos de la CLDN18.2 presentes en la superficie de células vivas. Preferentemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 se une a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 y 48-50. Preferentemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos o derivados de estos mencionados anteriormente. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 puede obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 y 48-50, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido. Preferentemente, el anticuerpo se une a las células cancerosas, en particular a las células de los tipos de cáncer mencionados anteriormente y, preferentemente, no se une sustancialmente a las células no cancerosas.

Preferentemente, la unión de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 a células que expresan CLDN18.2 induce o media la muerte de células que expresan CLDN18.2. Las células que expresan CLDN18.2 son, preferentemente, células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas tumorigénicas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar. Preferentemente, el anticuerpo induce o media la muerte de las células mediante la inducción de una o más de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis e inhibición de la proliferación de células que expresan CLDN18.2. Preferentemente, la lisis de las células mediada por ADCC tiene lugar en presencia de células efectoras, que en modalidades particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN. La inhibición de la proliferación de las células puede medirse in vitro mediante la determinación de la proliferación de células en un ensayo mediante el uso de bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse en el ADN recién sintetizado de las células en replicación (durante la fase S del ciclo celular), mediante la sustitución de la timidina durante la replicación del ADN. La detección del químico incorporado mediante el uso, por ejemplo, de anticuerpos específicos para BrdU indica que las células estuvieron activamente replicando su ADN.

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

a) especificidad por la CLDN18.2;

b) una afinidad de unión a la CLDN18.2 de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente, de aproximadamente 5-10 nM o menos y, con mayor preferencia, de aproximadamente 1-3 nM o menos,
c) la capacidad de inducir o mediar CDC en células positivas para CLDN18.2;
d) la capacidad de inducir o mediar ADCC en células positivas para CLDN18.2;
e) la capacidad de inhibir el crecimiento de células positivas para CLDN18.2;
f) la capacidad de inducir apoptosis de células positivas para CLDN18.2.

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

a. 182-D1106-055, núm. de acceso DSM ACC2737, depositado el 19 de octubre de 2005
b. 182-D1106-056, núm. de acceso DSM ACC2738, depositado el 19 de octubre de 2005
c. 182-D1106-057, núm. de acceso DSM ACC2739, depositado el 19 de octubre de 2005
d. 182-D1106-058, núm. de acceso DSM ACC2740, depositado el 19 de octubre de 2005
e. 182-D1106-059, núm. de acceso DSM ACC2741, depositado el 19 de octubre de 2005
f. 182-D1106-062, núm. de acceso DSM ACC2742, depositado el 19 de octubre de 2005,
g. 182-D1106-067, núm. de acceso DSM ACC2743, depositado el 19 de octubre de 2005
h. 182-D758-035, núm. de acceso DSM ACC2745, depositado el 17 de noviembre de 2005;
i. 182-D758-036, núm. de acceso DSM ACC2746, depositado el 17 de noviembre de 2005;
j. 182-D758-040, núm. de acceso DSM ACC2747, depositado el 17 de noviembre de 2005;
k. 182-D1106-061, núm. de acceso DSM ACC2748, depositado el 17 de noviembre de 2005;
l. 182-D1106-279, núm. de acceso DSM ACC2808, depositado el 26 de octubre de 2006;
m. 182-D1106-294, núm. de acceso DSM ACC2809, depositado el 26 de octubre de 2006,
n. 182-D1106-362, núm. de acceso DSM ACC2810, depositado el 26 de octubre de 2006.

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

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

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

En modalidades preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quiméricas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de esta. En modalidades preferidas adicionales, los

anticuerpos, en particular las formas quiméricas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena ligera (CL) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena ligera humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de esta. En una modalidad preferida particular, los anticuerpos, en particular las formas quiméricas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CH humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13 o un fragmento de esta y que comprende una CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NO: 12 o un fragmento de esta.

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

En ciertas modalidades preferidas, las formas quiméricas de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 y un fragmento de estas y/o comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y un fragmento de estas.

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

(i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 o un fragmento de esta,
(ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 15 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20 o un fragmento de esta,
(iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 o un fragmento de esta,
(iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 18 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 o un fragmento de esta,
(v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24 o un fragmento de esta,
(vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 23 o un fragmento de esta,
(vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26 o un fragmento de esta,
(viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27 o un fragmento de esta, y
(ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 19 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28 o un fragmento de esta.

Se prefiere particularmente el anticuerpo de acuerdo con (v).

"Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se usa anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpo, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpo acortada en el extremo N y/o C, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a la CLDN18.2 y, preferentemente, las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente descripción, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC. Preferentemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 80 %, preferentemente, al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 se refieren, preferentemente, a dicha secuencia en donde se eliminan 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoácidos en el extremo N.

En una modalidad preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34 y un fragmento de estas.

En una modalidad preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 y un fragmento de estas.

En ciertas modalidades preferidas, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) seleccionada entre las posibilidades siguientes (i) a (ix):

(i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 36 o un fragmento de esta,
(ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 35 o un fragmento de esta,
(iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 37 o un fragmento de esta,
(iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 40 o un fragmento de esta,
(v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39 o un fragmento de esta,
(vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 38 o un fragmento de esta,
(vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 41 o un fragmento de esta,
(viii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 42 o un fragmento de esta,
(ix) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 34 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 43 o un fragmento de esta.

Se prefiere particularmente el anticuerpo de acuerdo con (v).

En una modalidad preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende una VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas a partir de las modalidades siguientes (i) a (vi):

(i) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 14, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 14, CDR3: posiciones 116-125 de la SEQ ID NO: 14,
(ii) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 15, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 15, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 15,
(iii) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 16, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 16, CDR3: posiciones 116-124 de la SEQ ID NO: 16,
(iv) CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 17, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 17, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 17,
(v) CDR1: posiciones 44-51 de la SEQ ID NO: 18, CDR2: posiciones 69-76 de la SEQ ID NO: 18, CDR3: posiciones 115-125 de la SEQ ID NO: 18, y
(vi) CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19.

En una modalidad preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende una VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas a partir de las modalidades siguientes (i) a (ix):

(i) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 20, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 20, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 20,
(ii) CDR1: posiciones 49-53 de la SEQ ID NO: 21, CDR2: posiciones 71-73 de la SEQ ID NO: 21, CDR3: posiciones 110-118 de la SEQ ID NO: 21,
(ii) CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 22, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 22, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 22,
(iv) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 23, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 23, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 23,
(v) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 24, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 24, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 24,
(vi) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 25, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 25, CDR3: posiciones 115-122 de la SEQ ID NO: 25,
(vii) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 26, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 26, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 26,
(viii) CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 27, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 27, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 27, y

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

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

(i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 14, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 14, CDR3: posiciones 116-125 de la SEQ ID NO: 14, VL: CDR1: posiciones 49-53 de la SEQ ID NO: 21, CDR2: posiciones 71-73 de la SEQ ID NO: 21, CDR3: posiciones 110-118 de la SEQ ID NO: 21,
(ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 15, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 15, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 20, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 20, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 20,
(iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 16, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 16, CDR3: posiciones 116-124 de la SEQ ID NO: 16, VL: CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 22, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 22, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 22,
(iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de la SEQ ID NO: 18, CDR2: posiciones 69-76 de la SEQ ID NO: 18, CDR3: posiciones 115-125 de la SEQ ID NO: 18, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 25, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 25, CDR3: posiciones 115-122 de la SEQ ID NO: 25,
(v) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 17, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 17, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 17, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 24, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 24, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 24,
(vi) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 23, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 23, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 23,
(vii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 26, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 26, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 26,
(viii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 27, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 27, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 27, y
(ix) VH: CDR1: posiciones 45-53 de la SEQ ID NO: 19, CDR2: posiciones 71-78 de la SEQ ID NO: 19, CDR3: posiciones 117-128 de la SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 28, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 28, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 28.

En modalidades preferidas adicionales, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende, preferentemente, una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferentemente, al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2, preferentemente, de un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2 descrito en la presente descripción y, preferentemente, comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferentemente al menos la región variable CDR3, de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o regiones variables de cadena ligera (VL) descritas en la presente descripción. En una modalidad dicha una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en la presente descripción. En una modalidad preferida particularmente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 comprende preferentemente las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2, preferentemente, de un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2 descrito en la presente descripción y, preferentemente, comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o regiones variables de cadena ligera (VL) descrito en la presente descripción.

En una modalidad, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de los conjuntos de CDR como se describió en la presente descripción comprende dichas CDR junto con sus regiones marco intermedias. Preferentemente, la porción incluirá, además, al menos aproximadamente 50 % de una o ambas de las regiones marco primera y cuarta, el 50 % es el 50 % C terminal de la primera región marco y el 50 % N-terminal de la cuarta región marco. La construcción de los anticuerpos obtenidos mediante técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos N o C terminales a las regiones variables codificadas mediante los enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, lo que incluye la introducción de enlazadores para unir las regiones variables de la invención a secuencias adicionales de proteínas, lo que incluye cadenas pesadas de inmunoglobulinas, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas.

En una modalidad, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describió en la presente descripción comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.

La referencia en la presente descripción a un anticuerpo que comprende con respecto a la cadena pesada de este una cadena particular, o una región o secuencia particular se refiere, preferentemente, a la situación en donde todas las

cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica correspondientemente a la cadena ligera de un anticuerpo.

El término "ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, pretende incluir ADN y ARN. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, pero, preferentemente, es ADN bicatenario.

De acuerdo con la presente invención, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. Comprende también la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

La enseñanza dada en la presente descripción con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, aquellas que se muestran en el listado de secuencias, se debe interpretar para que, además, se relacionen las variantes de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a aquellas de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es conservar la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferentemente, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a CLDN18.2 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente descripción, por ejemplo la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

Los expertos en la técnica apreciarán que en particular las secuencias de las CDR, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a la CLDN18.2. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en la presente descripción. Por "altamente homóloga" se contempla que de 1 a 5, preferentemente, de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren homología sustancial con las regiones de anticuerpos específicamente descritos en la presente descripción.

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

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 secuencias de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque es posible también una inserción aleatoria con el tamizaje apropiado del producto resultante.

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

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

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. La preferencia está dada a las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio conservador de aminoácidos involucra la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En ocasiones la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente, de identidad entre una secuencia de aminoácidos determinada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de la secuencia de aminoácidos determinada será de al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. El grado de similitud o de identidad está dado, preferentemente, para una región del aminoácido que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o de identidad se da, preferentemente, para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al

menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferentemente, aminoácidos continuos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la técnica, preferentemente, mediante el uso del mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, mediante el uso de Align, mediante el uso de configuraciones estándar, preferentemente, EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. "Identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, se obtiene después del mejor alineamiento, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar las regiones locales con similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, se divide este número entre el número de posiciones comparadas, y se multiplica el resultado obtenido por 100 de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente, transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es, preferentemente, 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 manera que el ratón produce anticuerpos anti-CLDN18.2 humanos cuando se inmuniza con antígeno CLDN18.2 y/o células que expresan CLDN18.2. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tales como los ratones HCo7 o HCol2, 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 para la CLDN18.2 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al someterse a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

Como se usa en la presente descripción "reducir", "disminuir" o "inhibir" significan una disminución general o la capacidad para provocar una disminución general, preferentemente, de 5 % o mayor, 10 % o mayor, 20 % o mayor, con mayor preferencia,, de 50 % o mayor, y con la máxima preferencia de 75 % o mayor, en el nivel, por ejemplo en el nivel de expresión o en el nivel de proliferación de las células.

Los términos tales como "aumentar" o "potenciar", se refieren, preferentemente a un aumento o potenciación de aproximadamente al menos un 10 %, preferentemente al menos 20 %, preferentemente al menos 30 %, con mayor preferencia al menos 40 %, con mayor preferencia al menos 50 %, incluso con mayor preferencia al menos 80 %, y con la máxima preferencia al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10 000 % o incluso más.

Mecanismos de acción de los AcM

Aunque lo siguiente proporciona consideraciones con respecto al mecanismo subyacente a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención, no debe considerarse como limitante de la invención de ninguna manera.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción interactúan, preferentemente, con componentes del sistema inmunitario, preferentemente, a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse, además, para dirigir cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para matar directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, al atacar a tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunitarias antitumorales que pueden haberse comprometido debido a los efectos secundarios citotóxicos de un quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo,

los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden ejercer, además, un efecto simplemente mediante la unión a la CLDN18.2 en la superficie celular, lo que, por ejemplo, bloquea la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

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

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

Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más eficaz para la activación del complemento. Además, las IgG1 e IgG3 son ambas muy eficaces para dirigir la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo resulta en la exposición de sitios de unión múltiples C1q en estrecha proximidad en los dominios C_H2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estas exposiciones de los sitios de unión a C1q convierten la interacción C1q-IgG, previamente de baja afinidad, en una interacción de alta avidez, que dispara una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y que conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos, y activadores de las células efectoras, C3a y C5a. Preferentemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula.

Los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen 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, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B o técnicas de presentación en fagos mediante bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal que se prefiere para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen las parejas de fusión (por ejemplo, las células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

Otros sistemas de animales que se prefieren para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y el de conejo (por ejemplo, se describen en Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:9348 (1995), ver también Rossi y otros, Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Aún en otra modalidad preferida, los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como HuMAb y KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente descripción como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en el documento núm. WO2004 035607

Otra estrategia más para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente los genes que codifican los anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de especificidad definida, por ejemplo, ver Babcock y otros, 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Para obtener detalles sobre la modificación genética de anticuerpos recombinantes ver 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 los anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con portadores de péptidos conjugados derivados de la secuencia del antígeno, es decir, la secuencia contra la cual los anticuerpos deben dirigirse, una preparación enriquecida de antígeno expresado de manera recombinante o fragmentos de este y/o células que expresan el antígeno, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el antígeno o fragmentos de este. En caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no resulten en

anticuerpos, los ratones pueden también inmunizarse con células que expresan el antígeno, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria puede monitorearse en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por la vena de la cola o sangrados retroorbitales. Los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse de manera intraperitoneal o intravenosa con el antígeno que expresan las células 3 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, pueden aislarse los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse después para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Los pocillos individuales pueden tamizarse después mediante ELISA para hibridomas que secretan anticuerpos. Por análisis de Inmunofluorescencia y FACS mediante el uso de las células que expresan el antígeno, pueden identificarse los anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden replaquearse, tamizarse de nuevo, y si todavía son positivos para los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse in vitro para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para la caracterización.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse también en un transfectoma de células huésped mediante el uso, por ejemplo, de una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una modalidad, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa por el sistema GS de expresión del gen descritos en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped eucariotas, tales como las células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método que se usa para introducir estos genes puede estar entre los métodos que se describen 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 después pueden amplificarse para su nivel de expresión y aumentar su escala de producción de 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 las células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo, E. coli. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tales como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; ver por ejemplo Verma, R., y otros (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, y otros (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., y otros (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos pueden usarse como anticuerpos terapéuticos en humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radiactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los respectivos anticuerpos se quimerizan o humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra por la unión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de las cadenas pesada y ligera humana (por ejemplo como se describió por Kraus y otros, en Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8). En una modalidad que se prefiere los anticuerpos quiméricos se generan mediante la unión de la región constante de la cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En una modalidad que también se prefiere, los anticuerpos quiméricos pueden generarse mediante la unión de la región constante de la cadena ligera lambda humana a la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de la cadena pesada que se prefieren para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de la cadena pesada que se prefieren para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

Humanización

Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivos predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones

anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que mimeticen las propiedades de los anticuerpos específicos presentes de manera natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico presente de manera natural injertado en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y otros, (1998) Nature 332: 323-327; Jones, P. y otros, (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. y otros, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias génicas del anticuerpo maduro porque no incluirán los genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V (D) J durante la maduración de la célula B. Las secuencias de genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad a nivel individual uniformemente a través de la región variable.

La capacidad de los anticuerpos para unirse a un antígeno puede determinarse mediante el uso de ensayos de unión estándar (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, Inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

Para purificar los anticuerpos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Alternativamente, los anticuerpos pueden producirse en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. Las IgG eluidas pueden verificarse mediante la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 mediante el uso de un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen a epítopos únicos, puede usarse mutagénesis dirigida a sitio o dirigida a sitios múltiples.

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

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan el antígeno natural o después de la transfección y los controles negativos que carecen de la expresión del antígeno (cultivadas en condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene un 1 % de FBS, y pueden incubarse a 4 °C durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido a antígeno en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un instrumento FACS mediante el uso de las propiedades de dispersión lateral de la luz para atravesar las células vivas únicas. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de los ligandos no específicos en una única medición, puede emplearse 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 pueden detectarse en un canal de fluorescencia diferente al de las células teñidas con anticuerpos. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales antígeno específicos 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. Puede usarse un ensayo alternativo con microscopía de fluorescencia además de o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia.

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

Pueden prepararse extractos de células que expresan antígeno y controles negativos apropiados y someterlos 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 analizarán con sondas con los

anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión de IgG puede detectarse mediante el uso de peroxidasa anti-IgG de ratón y revelarse con sustrato ECL.

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

Puede evaluarse la capacidad de los anticuerpos para mediar la fagocitosis y la muerte de las células que expresan CLDN18.2. La prueba de la actividad de anticuerpos monoclonales in vitro proporcionará un tamizaje inicial antes de probar modelos in vivo.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), las células NK, los monocitos, las células mononucleares u otras células efectoras de donantes sanos pueden purificarse mediante centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % o, alternativamente, con suero humano inactivado por calor al 5 % y mezclado con células objetivo marcadas con ^{51}Cr que expresan CLDN18.2, en diversas relaciones de células efectoras con respecto a células objetivo. Alternativamente, las células objetivo pueden marcarse con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un fluorómetro puede medir un quelato altamente fluorescente de Europio con el ligando potenciador que se libera de las células muertas. Otra técnica alternativa puede usar la transfección de células objetivo con luciferasa. El amarillo lucifer añadido puede después oxidarse solamente por células viables. Las IgG anti-CLDN18.2 purificadas pueden añadirse a diversas concentraciones. Puede usarse IgG humana irrelevante como control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4 a 20 horas a 37 °C, en dependencia del tipo de célula efectora usada. Las muestras pueden analizarse para determinar la citólisis mediante la medición de la liberación de ^{51}Cr o la presencia del quelato EuTDA en el sobrenadante de cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida de las células viables.

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN18.2 también pueden analizarse en diversas combinaciones para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN18.2 pueden probarse en cuanto a su capacidad para mediar la CDC mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para complemento puede obtenerse de la sangre de una manera conocida por el experto. Para determinar la actividad CDC de los AcM, pueden usarse métodos diferentes. Puede medirse la liberación de ^{51}Cr, por ejemplo, o puede evaluarse la permeabilidad de membrana elevada mediante el uso de un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). En resumen, las células objetivo pueden lavarse y 5 x 10^5/ml pueden incubarse con diversas concentraciones de AcM durante 10-30 min. a temperatura ambiente o a 37 °C. Después puede añadirse suero o plasma a una concentración final de 20 % (v/v) y las células se incuban a 37 °C durante 20-30 min. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo mediante el uso de FACSArray.

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

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

Para evaluar la capacidad de iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN18.2 pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas para CLDN18.2, por ejemplo, células tumorales transfectadas SNU-16, DAN-G, KATO-III o CLDN18.2 a 37 °C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden cosecharse, lavarse en tampón de unión a Anexina-V (BD biosciences) e incubarse con Anexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante

15 min. en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (como se indicó anteriormente). Alternativamente, una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales puede detectarse con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, Núm. Cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células en proliferación en microplacas. La BrdU incorporada se detecta mediante el uso de un anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y el ADN se desnaturaliza mediante el uso de solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega el inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en la solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia que se mide, mediante el uso de fluorometría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pocillo.

Estudios preclínicos

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

Pueden realizarse estudios in vivo después de xenoinjertar células tumorales que expresan CLDN18.2 en ratones inmunocomprometidos u otros animales mediante el uso de anticuerpos descritos en la presente descripción. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones libres de tumor seguido de la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para prevenir la formación de tumores o síntomas relacionados con el tumor. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones que portan tumor para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, la metástasis o los síntomas relacionados con el tumor. La aplicación de anticuerpos puede combinarse con la aplicación de otras sustancias como fármacos citostáticos, inhibidores del factor de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la posible toxicidad de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por anticuerpos, los animales pueden inocularse con anticuerpos o reactivos control e investigarse a fondo para detectar posibles síntomas relacionados con la terapia con anticuerpos CLDN18.2. Los posibles efectos secundarios de la aplicación in vivo de los anticuerpos CLDN18.2 incluyen particularmente la toxicidad en tejidos que expresan la CLDN18.2, lo que incluye el estómago. Los anticuerpos que reconocen CLDN18.2 en humanos y en otras especies, por ejemplo, ratón, son particularmente útiles para predecir posibles efectos secundarios mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales CLDN18.2 en humanos.

El mapeo de epítopos reconocidos por anticuerpos puede realizarse 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.

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

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

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

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

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

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

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

El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de una naturaleza natural o sintética, en donde el componente activo se combina con el fin de facilitar, potenciar o habilitar la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "portador" también incluye uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación, que son adecuadas para la administración a un paciente.

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

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

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral que incluye por inyección o infusión. La administración es preferentemente parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden usualmente una preparación acuosa o no acuosa estéril del componente activo, que es, preferentemente, isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de portadores y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, se usan aceites fijados, usualmente estériles, como solución o medio de suspensión.

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

Una cantidad eficaz de un agente o composición descrito en la presente descripción dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, la condición fisiológica, la talla y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si se presenta), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes que se describen en la presente descripción pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial pueden usarse dosis más altas (o dosis eficazmente mayores alcanzadas por una vía de administración diferente, más localizada).

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a los pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como aquellos que se describen en la presente descripción. Los pacientes que se prefieren incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la administración de los agentes y composiciones descritas en la presente descripción. Esto incluye trastornos que involucran las células caracterizadas por un patrón alterado de la expresión de CLDN18.2.

Por ejemplo, en una modalidad, los anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para el tratamiento de un paciente con una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa tal como se describió en la presente descripción caracterizada por la presencia de células cancerosas que expresan CLDN18.2.

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento que se describen de acuerdo con la invención pueden usarse, además, para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad que se describe en la presente descripción.

La presente invención se ilustra, además, mediante los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como que limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio clínico de primer ensayo en seres humanos, de dosis única, multicéntrico, fase I, sin enmascaramiento, de escalado por infusión i.v. que evalúa la seguridad y la tolerabilidad de IMAB362 en pacientes hospitalizados con cáncer gastroesofágico avanzado

Se realizó un estudio clínico de primer ensayo en seres humanos, de dosis única, multicéntrico, fase I, sin enmascaramiento, de escalado por infusión i.v. en humanos con IMAB362 para determinar la dosis única máxima tolerada o aplicable (MTD) de IMAB362, examinar la seguridad, tolerabilidad y perfil de eventos adversos de IMAB362, determinar el perfil farmacocinético de dosis únicas en escalado de IMAB362, determinar la inmunogenicidad de una aplicación de

dosis única de IMAB362 y determinar la posible actividad antitumoral de IMAB362 en pacientes con cáncer gastroesofágico (GE) avanzado.

Este estudio se diseñó como un estudio clínico de primer ensayo en seres humanos fase I, multicéntrico, no aleatorizado, de escalado de dosis única entre pacientes, sin enmascaramiento, con una infusión intravenosa única de IMAB362 y un período de seguimiento sin tratamiento de 4 semanas.

Para incluirse en el estudio, los pacientes tenían que cumplir con todos los criterios de inclusión siguientes:

- Enfermedad metastásica, refractaria o recurrente de cáncer gastroesofágico avanzado comprobada mediante histología
- Expresión de CLDN18.2 confirmada mediante inmunohistoquímica o disponibilidad de una muestra de tejido del tumor adecuada para la determinación de la expresión de CLDN18.2
- Quimioterapia estándar anterior que contenía una fluoropirimidina, un compuesto de platino y/o epirrubicina y, si era clínicamente apropiado, docetaxel
- Al menos 1 sitio medible de la enfermedad de acuerdo con los criterios RECIST (barrido por tomografía computarizada (CT) o tomografía por resonancia magnética (MRT) no más antiguos de 6 semanas antes del ingreso al estudio)
- 18 años de edad o más
- Consentimiento informado por escrito después de ser informado del estudio
- estado funcional ECOG (PS) 0-1 o Karnofsky del 70-100 %
- Esperanza de vida > 3 meses
- Recuento de plaquetas ≥ 100 000/mm^3
- Hemoglobina ≥ 10 g/dl
- INR < 1,5
- Bilirrubina normal
- AST y ALT < 2,5 veces el límite superior del normal (ULN) (5 veces ULN si se presentan metástasis hepáticas)
- Creatinina < 1,5 x ULN
- Para mujeres con maternidad potencial (última menstruación menos de 2 años antes de la inscripción): Prueba de embarazo negativa (β-HCG) al inicio del estudio y mediante el uso de dos métodos anticonceptivos altamente eficaces durante 8 semanas después de la infusión del fármaco del estudio
- Los pacientes masculinos deben usar un método anticonceptivo aceptado durante 8 semanas después de la infusión del fármaco del estudio.

Los pacientes que presentaban uno o más de los criterios siguientes no debían incluirse en el estudio:

- Embarazo o lactancia
- Reacción alérgica anterior o intolerancia a un anticuerpo monoclonal, lo que incluye anticuerpos humanizados y quiméricos
- Inclusión anterior en el presente estudio
- Menos de 3 semanas desde la quimioterapia o radioterapia antitumoral anterior
- Otros agentes o dispositivos de investigación simultáneamente o dentro de las 4 semanas anteriores a este estudio
- Otros agentes o terapias simultáneas contra el cáncer
- Historial de pruebas positivas para el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- Hepatitis conocida
- Enfermedad no controlada o grave lo que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las siguientes:
  - Infección continua o activa que requiere antibióticos parenterales
  - Insuficiencia cardíaca congestiva sintomática
  - Angina de pecho inestable
  - Hipertensión no controlada
  - Arritmia cardíaca significativa clínicamente
  - Infarto del miocardio dentro de los últimos 6 meses
  - Sangrado gástrico dentro de las últimas cuatro semanas
  - Úlcera péptica sintomática
  - Síntomas clínicos de metástasis cerebral o metástasis documentada
  - Enfermedades psiquiátricas o situaciones sociales que impedirían el cumplimiento del estudio
- Administración simultánea de agentes anticoagulantes con antagonistas de la vitamina K (por ejemplo, Coumadin)
- Administración simultánea de dosis terapéuticas de heparina (se aceptan dosis profilácticas).

De un total de 29 pacientes, 15 pacientes recibieron medicación del estudio y se asignaron a una de las cohortes de dosis (33, 100, 300, 600 o 1000 mg de IMAB362/m^2). Estos pacientes formaron la población de seguridad (SP). Como no se produjeron toxicidades potencialmente limitantes de la dosis en ninguno de los grupos de dosis, no tuvieron que analizarse pacientes adicionales para confirmar posibles toxicidades limitantes de la dosis. Por lo tanto, no más de 3 pacientes en cada cohorte de dosis, es decir, 15 pacientes en total, recibieron medicación del estudio.

La asignación de pacientes a las diferentes cohortes de dosis de IMAB362 se proporciona en la Tabla 1, más abajo.

Tabla 1: Asignación de pacientes

Cohorte de dosis de IMAB362	Núm. de Paciente
33 mg/m^2	0201
	0103
	0104
100 mg/m^2	0202
	0105
	0203
300 mg/m^2	1101
	0403
	1201
600 mg/m^2	0302
	0204
	1202
1000 mg/m^2	0205
	0106
	0112

Ningún paciente finalizó el estudio prematuramente, es decir, todos los pacientes completaron el estudio de acuerdo con el protocolo.

A. Evaluación de seguridad

Se descubrió que IMAB362 era seguro y bien tolerado.

Solo 25 AE (eventos adversos), que se produjeron en 8 de los pacientes, se calificaron como relacionados con el tratamiento. Los AE relacionados con el tratamiento fueron similares entre los grupos de dosis. Más de la mitad de estos AE fueron trastornos gastrointestinales (principalmente náuseas, vómitos). Solo uno de estos AE relacionados se calificó como severo (vómitos), mientras que todos los demás fueron leves o moderados. Todos los AE relacionados se recuperaron, excepto un caso de disgeusia (CTC grado 1 (leve)) con resultado desconocido y un caso de aumento de GGT (CTC grado 2 (moderado)) que no se recuperó.

No se observó en ninguno de los grupos de dosis toxicidad limitante de la dosis (DLT), definida como una AE relacionada con el tratamiento que se produjo durante o dentro de las cuatro semanas posteriores a la infusión del fármaco del estudio y que fue toxicidad de grado 3 (excepto náuseas, vómitos y alopecia) o toxicidad de grado 4 o 5 (de acuerdo con CTC versión 3.0). En consecuencia, la dosis única máxima tolerada o aplicable (MTD) de IMAB362 determinada en el presente estudio es 1000 mg/m^2.

Ningún SAE relacionado y ninguna sospecha de reacción adversa grave inesperada (SUSAR) se produjo en el presente estudio.

Solo 7 pacientes tenían al menos un valor de laboratorio fuera del intervalo de referencia evaluado como grado 3 (grave). No se observó relación dosis-efecto ni relación clara con el fármaco del estudio. No se informaron valores de laboratorio de CTC grado 4 (con amenaza para la vida) o 5 (muerte).

En conclusión, no pudieron verse diferencias relevantes en el perfil de AE y otros parámetros de seguridad entre los grupos de dosis. En términos generales, se observó que el IMAB362 administrado en una dosis única era seguro y bien tolerado, al ser las náuseas y los vómitos el evento adverso relacionado más común.

B. Evaluación de farmacocinética e inmunogenicidad

Para determinar la concentración del fármaco, se midieron los niveles séricos de IMAB362 de todos los pacientes inmediatamente antes de la infusión de la medicación del estudio, al final de la infusión, a las 3, 8, 12 y 24 horas después del final de la infusión y en los días 3 (V3), 5 (V4), 8 (V5), 15 (V6) y 29 (V7).

En la Tabla 2 se proporciona una visión general de los niveles séricos de IMAB362 en el curso del estudio para cada paciente. Por razones desconocidas para un paciente (núm. 1201) en el grupo de dosis de 300 mg/m^2 se midió un nivel sérico de IMAB362 bajo (12,633 µg/ml) ya antes de la infusión del fármaco del estudio (V2, día 0).

Tabla 2: Curso temporal del nivel sérico de IMAB362 [µg/ml] por paciente

Núm. de Paciente	Grupo de dosis de IMAB362	V2 0 h después de la infusión	V2 3 h después de la infusión	V2 8 h después de la infusión	V2 12 h después de la infusión	V2 24 h después de la infusión	V3 día 2	V4 día 5 (± 1)	V5 día 8 (± 1)	V6 día 15 (± 2)	V7 día 29 (± 7)
0103	33 mg/m^2	14,9	14,6	12,1	13,7	11,7	8,0	5,3	5,4	3,8	1,9
0104	33 mg/m^2	12,5	15,1	12,3	10,1	9,7	11,3	7,0	3,6	2,3	1,3
0201	33 mg/m^2	15,4	12,6	12,7	10,6	11,2	9,5	9,5	6,6	5,3	2,3
0105	100 mg/m^2	75,6	65,8	61,6	63,4	48,8	37,5	24,4	19,0	15,8	11,3
0202	100 mg/m^2	59,3	49,4	47,4	41,2	41,4	35,6	18,5	17,1	12,8	6,4
0203	100 mg/m^2	38,5	36,8	41,1	35,5	36,6	25,4	19,6	18,2	12,6	6,3
0403	300 mg/m^2	-	164,2	161,6	125,0	114,0	90,2	59,8	43,9	20,9	11,4
1101	300 mg/m^2	176,1	171,5	145,5	150,5	146,5	86,3	65,9	65,3	42,7	36,8
1201	300 mg/m^2	153,1	169,5	147,7	124,6	97,8	135,1	124,3	63,7	47,7	33,3
0204	600 mg/m^2	315,7	298,2	285,8	284,3	340,4	218,0	136,7	-	87,5	52,9
0302	600 mg/m^2	361,6	335,0	342,6	285,1	239,1	140,9	82,2	28,4	11,0	2,0
1202	600 mg/m^2	242,2	290,1	281,0	237,6	207,9	170,2	131,6	58,1	37,0	23,6
0106	1000 mg/m^2	493,7	606,1	488,9	465,9	452,7	367,8	259,9	158,8	79,3	34,7
0112	1000 mg/m^2	359,0	465,9	375,9	356,5	311,0	273,1	220,6	192,8	154,1	84,4
0205	1000 mg/m^2	479,7	435,9	366,7	331,6	343,9	279,7	193,9	155,3	105,9	38,9

* La concentración máxima ($C_{máx}$) de cada paciente se imprime en negritas

Las concentraciones máximas medias observadas ($C_{máx}$) por grupo de dosis se muestran en la Tabla 3. Los valores medios aumentados para la $C_{máx}$ se corresponden con las dosis crecientes de infusión de IMAB362.

Tabla 3: Concentraciones máximas ($C_{máx}$) de IMAB362 durante el estudio - Resumen de estadísticas descriptivas

Grupo de dosis de IMAB362	$C_{máx}$ [µg/ml]					
	N	Media	SD	Mín	Media	Máx
33 mg/m^2	3	15,1	0,3	14,9	15,1	15,4
100 mg/m2	3	58,7	17,3	41,1	59,3	75,6

300 mg/m^2	3	169,9	5,9	164,2	169,5	176,1
600 mg/m^2	3	330,7	36,7	290,1	340,4	361,6
1000 mg/m^2	3	517,3	77,3	465,9	479,7	606,1

En la Figura 1 se proporciona una representación gráfica de las concentraciones medias en sangre de IMAB362 durante el estudio.

Los niveles más altos de IMAB362 se midieron desde directamente al final de la infusión hasta 8 horas después del final de la infusión. A las 3 horas después del final de la infusión, la concentración media de IMAB362 fue de 14,1 µg/ml en el grupo de 33 mg/m^2, 50,7 µg/ml en el grupo de 100 mg/m^2, 164,2 µg/ml en el grupo de 300 mg/m^2, 307,8 µg/ml en el grupo de 600 mg/m^2 y 502,6 µg/ml en el grupo de 1000 mg/m^2.

La farmacocinética del IMAB362 es dependiente de la dosis. Los niveles de dosis más altos se observaron dentro de las primeras 8 horas después de la infusión de 2 horas. La semivida media de IMAB362 fue de 8,5 días en general y osciló de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 días en las diferentes cohortes de dosis.

Determinamos a partir de los estudios del modo de acción *in vitro* que puede esperarse, a concentraciones de IMAB362 de 50 µg/ml, la ejecución robusta de efectos contra las células antitumorales a través de ADCC, CDC e inhibición de la proliferación y que los valores de EC_{50} de ADCC y CDC, que se consideran como el modo de acción principal, incluso se cubren con la mitad de este nivel de concentración. Basado en este conocimiento, se identificaron los niveles de dosis de 300 mg/m^2 y 600 mg/m^2 para una evaluación más detallada en estudios de dosis múltiples con IMAB362. Los pacientes que recibieron 300 mg/m^2 y 600 mg/m^2 de IMAB362 estuvieron claramente por encima de estos niveles en el día 8 (V5) y cerca de 50 µg/ml en el día 15 (V6).

No hubo evidencia de anticuerpos anti-fármaco en los pacientes después de esta dosis única de IMAB362.

C. Evaluación de la actividad antitumoral

La medición principal para la evaluación de la posible actividad antitumoral fue el estado del tumor de acuerdo con la clasificación RECIST (versión 1.0) a las 2 a 5 semanas después de la infusión de IMAB362 (V6/V7). Como todos los pacientes completaron el estudio de acuerdo con el protocolo, las evaluaciones se realizaron exclusivamente en V7, es decir, 4 a 5 semanas después de la infusión del fármaco. Todos los pacientes se evaluaron mediante CT.

Tres pacientes no tenían enfermedad medible (los pacientes 1101 y 1201 no tenían lesión objetivo, para el paciente 0302 los datos respectivos no estaban disponibles) pero se incluyeron en la población para el análisis de la actividad antitumoral, ya que esta no era una evaluación formal de la eficacia.

En general, para ninguno de los pacientes pudo evaluarse una respuesta completa o parcial. Se observó enfermedad estable en uno de los 15 pacientes en el grupo de dosis de 600 mg/m^2. Mientras que en los pacientes tratados, el porcentaje de células tumorales con tinción positiva para CLDN18.2 varió de 1 % a 80 % (hasta 50 % de células tumorales con tinción membranosa), 90 % o más de las células tumorales de este paciente se tiñeron positivamente para CLDN18.2 con una gran fracción de las células tumorales con tinción membranosa presente. Dos pacientes en el grupo de 300 mg/m^2 tampoco progresaron y, como no tenían lesión objetivo, no fueron evaluables para la respuesta objetiva del tumor y se clasificaron como sin CR, sin PD. La duración de la SD fue de aproximadamente 2 meses. La duración de sin CR, sin PD fue de aproximadamente dos meses y 6 semanas, respectivamente.

En la tabla 4 se proporciona una visión general de la respuesta global por paciente.

Tabla 4: Estado del tumor (respuesta global) en V7 por paciente

Cohorte de dosis de IMAB362	Núm. de Paciente	Estado del tumor en V7
33 mg/m^2	0103	Enfermedad progresiva
	0104	Enfermedad progresiva
	0201	Enfermedad progresiva
100 mg/m^2	0105	Enfermedad progresiva
	0202	Enfermedad progresiva
	0203	Enfermedad progresiva

300 mg/m^2	0403	Enfermedad progresiva
	1101*	Sin CR, sin PD
	1201*	Sin CR, sin PD
600 mg/m^2	0204	Enfermedad estable
	0302*	Enfermedad progresiva
	1202	Enfermedad progresiva
1000 mg/m^2	0106	Enfermedad progresiva
	0112	Enfermedad progresiva
	0205	Enfermedad progresiva
* Pacientes sin enfermedad medible (los pacientes 1101 y 1201 no tenían lesión objetivo, para el paciente 0302 los datos respectivos no estaban disponibles)		

A continuación se describen los diferentes parámetros que contribuyen a la evaluación del estado del tumor (respuesta global).

Con respecto al cambio en la suma de los diámetros más largos (lesión objetivo), el estado de las lesiones no objetivo después del tratamiento con IMAB362, la aparición de nuevas lesiones, se proporciona una visión general de los resultados de la evaluación después del tratamiento con IMAB362 (evaluado en V7) en la Tabla 5.

Tabla 5: Evaluación de parámetros para la evaluación del estado del tumor en V7 por paciente

Grupo de dosis de IMAB362	Núm. de Paciente	Cambio porcentual en la suma del diámetro más largo en la lesión objetivo	Progresión inequívoca de una lesión no objetivo	Nuevas lesiones
33 mg/m^2	0103	+30,2 %	si	no
	0104	+10,0 %	si	si
	0201	+33,3 %	si	si
100 mg/m^2	0105	+25,9 %	no	si
	0202	+35,9 %	si	si
	0203	+35.1 %	Sin lesión no objetivo	no
300 mg/m^2	0403	-37,8 %	si	si
	1101	Sin lesión objetivo	Datos no disponibles	no
	1201	Sin lesión objetivo	no	no
600 mg/m^2	0204	+7,4 %	no	no
	0302	Datos no disponibles	Datos no disponibles	si
	1202	+66,7 %	no	si
1000 mg/m^2	0106	+36,5 %	no	si
	0112	+40,0 %	no	no
	-0205	-2,8 %	Sin lesión no objetivo	si

El cambio porcentual en la suma de los diámetros más largos de la lesión objetivo de V1 a V7 no mostró ninguna diferencia clara para las diferentes dosis de tratamiento.

Para las lesiones no objetivo, se informó una progresión inequívoca (de V1 a V7) con mayor frecuencia en pacientes en los niveles de dosis más bajos pero no en los niveles de dosis de 600 mg/m^2 y 1000 mg/m^2.

En un paciente en el grupo de 300 mg/m^2 (0403) se observó una progresión inequívoca en la lesión no objetivo y una disminución en el diámetro más largo en un ganglio linfático de la lesión objetivo.

Con respecto a nuevas lesiones, no se observó preferencia por uno de los grupos de dosis.

En el caso de los pacientes 0302 (grupo de dosis de 600 mg/m^2) y 0205 (grupo de dosis de 1000 mg/m^2) la aparición de nuevas lesiones fue el motivo para la evaluación de la respuesta global como enfermedad progresiva.

Para la evaluación del estado de las lesiones no objetivo de acuerdo con RECIST, el laboratorio central determinó el nivel de los antígenos tumorales séricos CA 125, CA 15-3, CA 19-9 y CEA en V2 (día 1, anterior a la infusión), V6 y V7.

En la Tabla 6 se ofrece una visión general de los marcadores tumorales séricos para los 3 pacientes con una respuesta global de al menos enfermedad estable.

Tabla 6: Marcadores tumorales en suero durante el estudio de pacientes con respuesta global de al menos enfermedad estable

Grupo de dosis	ID del Paciente	Marcador tumoral	Punto temporal	Nivel	Fuera del intervalo de referencia
300 mg/m^2					
	1101	CA 125	V2 (anterior a la infusión)	21,2 U/ml	
			V6	20,6 U/ml	
			V7	27,7 U/ml	
		CA 15-3	V2 (anterior a la infusión)	21,3 U/ml	
			V6	21,0 U/mL	
			V7	21,3 U/ml	
		CA 19-9	V2 (anterior a la infusión)	< 0,6 U/ml	
			V6	< 0,6 U/ml	
			V7	< 0,6 U/ml	
		CEA	V2 (anterior a la infusión)	1,7 ng/ml	
			V6	2,0 ng/ml	
			V7	2,1 ng/ml	
	1201	CA 125	V2 (anterior a la infusión)	13,5 U/ml	
			V6	13,7 U/ml	
			V7	11,5 U/ml	
		CA 15-3	V2 (anterior a la infusión)	11,6 U/ml	
			V6	11,3 U/ml	
			V7	11,3 U/ml	
		CA 19-9	V2 (anterior a la infusión)	68,0 U/ml	si
			V6	68,8 U/ml	si
			V7	63,0 U/ml	si
		CEA	V2 (anterior a la infusión)	3,2 ng/ml	
			V6	2,6 ng/ml	
			V7	3,0 ng/ml	
600 mg/m2					
	0204	CA 125	V2 (anterior a la infusión)	59,2 U/ml	si

			V6	50,2 U/ml	si
			V7	35,1 U/ml	si
		CA 15-3	V2 (anterior a la infusión)	477,5 U/ml	si
			V6	372,3 U/ml	si
			V7	310,4 U/ml	si
		CA 19-9	V2 (anterior a la infusión)	> 10 000 U/ml	si
			V6	5667 U/ml	si
			V7	3979 U/ml	si
		CEA	V2 (anterior a la infusión)	40,3 ng/ml	si
			V6	25,2 ng/ml	si
			V7	19,4 ng/ml	si

De los 3 pacientes con enfermedad estable o sin CR/sin PD de acuerdo con la obtención de imágenes, dos pacientes tenían niveles estables de marcadores tumorales en el período de observación. Un paciente (0204) mostró una disminución profunda de todos los 4 marcadores tumorales después del tratamiento. La mayoría de los pacientes con enfermedad progresiva, por el contrario, experimentaron un aumento de los niveles de marcadores tumorales.

El estado del tumor (de acuerdo con la clasificación RECIST) a las 4 a 5 semanas después de la infusión de IMAB362 (V6/V7) se comparó con el valor inicial. En general, para ninguno de los pacientes pudo evaluarse una respuesta completa o parcial. Uno de los 15 pacientes (en el grupo de dosis de 600 mg/m^2) mostró enfermedad estable al final del estudio. Dos pacientes en el grupo de dosis de 300 mg/m^2 con enfermedad no medible mostraron sin CR/sin PD. En línea con esto, los niveles de marcadores tumorales de estos tres pacientes se mantuvieron estables (2 pacientes) o incluso disminuyeron profundamente (1 paciente). La mayoría de los pacientes con enfermedad progresiva mostraron un aumento de los niveles de marcadores tumorales en el tiempo.

En cuanto a los parámetros que contribuyen a la evaluación del estado del tumor (respuesta global), se observó una disminución en una lesión en el grupo de dosis de 300 mg/m^2. En el tamizaje (V1), 13 de los 15 pacientes tenían un total de 32 lesiones no objetivo. Después del tratamiento con IMAB362 (evaluado en V7), se informó una progresión inequívoca de una lesión no objetivo para un total de 5 pacientes, 3 en el grupo de dosis de 33 mg/m^2, 1 en el grupo de dosis de 100 mg/m^2 y 1 en el grupo de dosis de 300 mg/m^2. Para ninguno de estos 5 pacientes, la respuesta global se evaluó como enfermedad progresiva solo debido a la progresión de sus lesiones no objetivo. Se observaron un total de 17 nuevas lesiones en el curso del estudio, distribuidas uniformemente entre los grupos de dosis. En el caso de 2 pacientes (en los grupos de dosis de 600 mg/m^2 y 1000 mg/m^2) la aparición de nuevas lesiones fue el motivo para la evaluación de la respuesta global como enfermedad progresiva.

Además, se recolectaron datos auxiliares en pacientes seleccionados, que muestran que los componentes del suero de los pacientes y las PBMC de los pacientes son completamente funcionales y potentes para mediar los principales modos de acción de IMAB362, CDC y ADCC, respectivamente.

En conclusión, se observaron indicios de actividad antitumoral (enfermedad estable, disminución del marcador tumoral) en los grupos de dosis de 300 mg/m^2 y 600 mg/m^2. Debido al pequeño tamaño de muestra de los grupos de dosis, es difícil concluir sobre las tendencias de eficacia.

C. Conclusiones generales

Este ensayo se diseñó como estudio clínico de primer ensayo en seres humanos fase I, multicéntrico, no aleatorizado, de escalado de dosis única entre pacientes, sin enmascaramiento, con una infusión intravenosa única de IMAB362 y un período de seguimiento sin tratamiento de 4 semanas.

Un total de 15 pacientes recibieron medicación del estudio y se asignaron a una de las cohortes de dosis (33, 100, 300, 600 o 1000 mg de IMAB362/m^2). Los grupos de dosis pueden considerarse comparables. No pudieron observarse desequilibrios relevantes con respecto a los datos demográficos y las características iniciales.

Con respecto al objetivo principal del estudio, no se observó toxicidad limitante de la dosis (DLT) en ninguno de los grupos de dosis. Por lo tanto, la dosis única aplicable de IMAB362 en el presente estudio fue 1000 mg/m^2. El IMAB362 fue seguro y bien tolerado con náuseas y vómitos como los eventos adversos relacionados más comunes.

El perfil de AE y la incidencia de AE fueron similares en los diferentes grupos de dosis. No se observaron diferencias aparentes entre los grupos de dosis en los números de pacientes individuales con deterioros significativos clínicamente en ninguno de los parámetros hematológicos, bioquímicos o de coagulación.

Con respecto a la actividad antitumoral potencial de IMAB362 de acuerdo con los criterios RECIST, no pudo observarse una respuesta completa o parcial para ninguno de los pacientes. Uno de los 15 pacientes (en el grupo de dosis de 600 mg/m^2) mostró enfermedad estable al final del estudio. Dos pacientes en el grupo de dosis de 300 mg/m^2 con enfermedad no medible mostraron sin CR/sin PD. De estos 3 pacientes con enfermedad estable de acuerdo con la obtención de imágenes, dos tenían niveles estables de marcadores tumorales en el período de observación. Un paciente mostró una disminución profunda de todos los 4 marcadores tumorales después del tratamiento.

Este y los estudios farmacocinéticos, que muestran que los niveles séricos específicos para IMAB362 se alcanzan a niveles de dosis de 600 mg/m^2, respaldan que esta dosis debe evaluarse más a fondo.

Además, los datos auxiliares confirman que los efectores inmunitarios de los pacientes son completamente funcionales y potentes en la mediación de los principales modos de acción IMAB362, CDC y ADCC, respectivamente.

Ejemplo 2: Potencia del fármaco

Los objetivos de los análisis in vitro realizados para este estudio clínico de Fase I incluyeron un análisis de si (i) las células efectoras presentes en la sangre del paciente son capaces de inducir ADCC dependiente de IMAB362, (ii) el sistema del complemento del paciente es capaz de inducir CDC dependiente de IMAB362 y (iii) la capacidad de IMAB362 para inducir ADCC y CDC se altera después de la administración en pacientes.

Se realizaron diferentes tipos de ensayos para estudiar en detalle la actividad citolítica inducida por IMAB362 después de la administración en pacientes. Los ensayos se realizaron con suero de pacientes o con PBMC de pacientes aislados a partir de muestras de sangre (Tabla 7). Para comparar y verificar la funcionalidad de los ensayos de CDC y ADCC en suero, se incluyó en paralelo en cada ensayo una agrupación de suero humano (generado a partir de sujetos humanos sanos), en el que el IMAB362 fresco se diluyó en serie. Para evaluar la funcionalidad de los ensayos de ADCC con PBMC, se usaron células sanguíneas aisladas a partir de un donante sano como control positivo en el mismo ensayo para cada paciente.

A. MATERIALES Y MÉTODOS

Para los diferentes ensayos *in vitro* se recolectaron muestras de suero de pacientes antes de la infusión de IMAB362 y 1, 7, 14 y 28-32 días después de la administración del anticuerpo IMAB362 (Tabla 7). Estos usaron como una fuente de anticuerpo IMAB362 y complemento en ensayos de CDC o como fuente de anticuerpo en ensayos de ADCC en suero. El suero previo a la infusión de los pacientes se usó como control negativo "sin IMAB362" y para la dilución de las muestras de suero del paciente para ajustar la concentración de IMAB362 a 0,5 µg/ml. Se recolectaron muestras de sangre fresca 14 días después de la infusión (7 días para el paciente 0203) y se usaron como fuente de células efectoras para los ensayos de ADCC.

Tabla 7: Visión general de las muestras de suero y sangre recolectadas para cada paciente, n.o.: no se obtuvo muestra de suero del sitio del estudio clínico

Núm. del sujeto	Dosis de IMAB362 [mg/m^2]	Anterior a la infusión (s/n)	Suero obtenido después de la perfusión en el día				Sangre obtenida en el día
0201	33	y	1	7	14	30	14
0202	100	y	1	7	14	28	14
0203	100	y	1	7	14	28	14
0403	300	y	1	7	14	28	7
0204	600	y	1	n.o.	14	32	14
0205	1000	y	1	7	14	30	14

Se recolectaron muestras de sangre de pacientes (Tabla 7), se obtuvo el suero y las alícuotas de suero se prepararon e inmediatamente se almacenaron a -80 °C. El análisis de todas estas muestras se realizó en un solo experimento después de la recolección de todas las 24 muestras de suero.

Para la ADCC, se usaron muestras de sangre fresca (15 ml de Na_2EDTA) para aislar PBMC y se realizaron ensayos de ADCC al día siguiente.

Se evaluó *ex vivo* la capacidad de las PBMC de los pacientes para inducir ADCC junto con IMAB362 mediante el uso de 15 ml de muestras de sangre con anticoagulante Na_2-EDTA frescas obtenidas a partir de los pacientes a los 14 días (7 días para el paciente 0203) después de la administración de IMAB362. Las PBMC de muestras de sangre se aislaron a la llegada mediante el uso de centrifugación de gradiente por densidad de Ficoll. Las PBMC se cultivaron durante 24 h y los ensayos de ADCC se realizaron al día siguiente con células de cáncer gástrico humano NUGC4 positivas para CLDN18.2 transfectadas con luciferasa como objetivos junto con diversas concentraciones de IMAB362 añadido exógenamente. Se añadieron las PBMC en una relación E:T de 20:1 y los ensayos se incubaron durante 24 h a 37 °C, CO_2 al 5 %. Las PBMC obtenidas de un donante sano se analizaron en el mismo contexto en paralelo para analizar la validez del ensayo (control de ensayo positivo). Esta madre de PBMC se almacenó en N_2 líquido y para cada ensayo de ADCC con PBMC de pacientes, se descongeló una alícuota a partir de esta madre de PBMC y se analizó en paralelo.

Los materiales caracterizados usados fueron:

- Células objetivo positivas para CLDN18.2: células de cáncer de estómago NUGC4-10cH11E10 transfectadas transitoriamente con luciferasa
- Células efectoras de control positivo: PBMC obtenidas a partir de un donante sano (identificación del lote de madre congelada con N_2: 276-SMS-09-00706, 4e7c/vial, MNZ, 08.07.07.SJA)
- Anticuerpo de control funcional: IMAB362 en diluciones en serie (0,4 ng/ml -126,5 µg/ml)
- Anticuerpo control negativo del ensayo: Control de isotipo (Rituximab, 126,5 µg/ml)

Se analizó *ex vivo* la capacidad de los componentes del suero del paciente para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) junto con IMAB362 en el tiempo. Las muestras de suero se recolectaron y almacenaron a -80 °C y todas las muestras de pacientes se analizaron en paralelo en el mismo experimento.

Además del suero anterior a la infusión al que se añadió de manera exógena una cantidad establecida de 0,5 µg/ml de IMAB362 (que representa la concentración $EC50_{\text{in vitro}}$), también se evaluaron muestras recolectadas a los 1, 7, 14 y 28-32 días después de la administración de IMAB362, en las que el IMAB362 circulante tuvo que ajustarse a 0,5 µg/ml (CDC con normalización). La concentración sérica final en cada ensayo se ajustó al 20 %. Las células CHO-K1 transfectadas con luciferasa, transfectadas de manera estable con CLDN18.2 se usaron como objetivos. Para la comparación, se probó una agrupación de suero humano de donantes sanos con la adición de IMAB362.

Los materiales caracterizados usados fueron:

- Células objetivo positivas para CLDN18.2: Células CHO-K1 p740 luci # 2A5 transfectadas de manera estable.
- Control positivo del ensayo: Diluciones en serie de IMAB362 (1:3,16) preparadas en una agrupación de suero humano de donantes sanos, lo que resultó en concentraciones finales que variaban de 31,6 ng/ml a 10,0 µg/ml.
- Anticuerpo de control funcional: El IMAB362 se ajustó a la concentración final de ensayo de 0,5 µg/ml en cada muestra de suero anterior a la infusión del paciente.
- Anticuerpo control negativo del ensayo: Anticuerpo de control de isotipo diluido en una agrupación de suero humano (Rituximab).

La cinética de la citotoxicidad general mediada por IMAB362 en la circulación humana, al integrar su capacidad para inducir ADCC y CDC, se analizó en un ensayo de "un tubo".

El suero de cada paciente recolectado 7, 14 y 28-32 días después de la administración i.v. de IMAB362, y por lo tanto que comprende los factores del complemento del paciente más el IMAB362 circulante, se probó en este ensayo. Se aplicó suero en cada ensayo a una concentración sérica final del 25 % (v/v). Las PBMC de un control sano se añadieron como células efectoras, mientras que células NUGC-4 sirvieron como células objetivo con una relación E:T de 40:1.

En una configuración adicional, el suero se inactivó con calor lo que destruyó la actividad del complemento. Por lo tanto, este segundo ensayo refleja exclusivamente la actividad ADCC inducida por el IMAB362 presente en el suero del paciente.

Durante el estudio Fase I, se recolectaron muestras de suero y se almacenaron a -80 °C. Todas las muestras de los pacientes se analizaron en paralelo en el mismo experimento.

Los materiales caracterizados usados fueron:

- Células objetivo positivas para CLDN18.2: Células de cáncer de estómago NUGC-4 10CH11 luci eGFP núm. 2 transfectadas de manera estable con luciferasa.
- Células efectoras: PBMC a partir de un donante sano (capa leucocitaria fresca).
- Anticuerpo de control funcional: Diluciones en serie de IMAB362 (0,26 ng/ml - 200,0 µg/ml) añadidas en una agrupación de suero humano.
- Muestra de control positivo: Muestra de suero anterior a la infusión del paciente con adición de IMAB362 (200,0 µg/ml) (representa una $EC_{80\text{-}100}$ para IMAB362 en esta configuración).
- Anticuerpo control negativo del ensayo: Anticuerpo de control de isotipo en agrupación de suero humano (Rituximab).

Se analizó, *ex vivo*, la capacidad de IMAB362 para interactuar y activar el complemento presente en el suero del paciente y para inducir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) después de una circulación prolongada en sangre del paciente, 1, 7, 14 y 28-32 días después de la administración de IMAB362. El ensayo se realizó directamente mediante el uso de las muestras de suero del paciente en el ensayo (CDC sin normalización). Se usó como control positivo un suero anterior a la infusión al que se añadió de manera exógena una cantidad ajustada de 10 µg/ml de IMAB362 (que representa la concentración EC*90-100* $_{\text{in vitro}}$). La concentración sérica final en cada ensayo se ajustó al 20 %. Las células CHO-K1 transfectadas con luciferasa, transfectadas de manera estable con CLDN18.2 se usaron como objetivos. Para la comparación, se probó una agrupación de suero humano de donantes sanos con la adición de IMAB362.

Durante el estudio de fase I, se recolectaron muestras de suero y se almacenaron a -80 °C. Todas las muestras de los pacientes se analizaron en paralelo en el mismo experimento.

Los materiales caracterizados usados fueron:

- Células objetivo positivas para CLDN18.2: Células CHO-K1 p740 luci # 2A5 transfectadas de manera estable.
- Anticuerpo de control funcional: Diluciones en serie de IMAB362 (1:3,16) preparadas en una agrupación de suero humano de donantes sanos, lo que resultó en concentraciones finales que variaban de 31,6 ng/ml a 10,0 µg/ml.
- Muestra de control positivo: Muestras de suero anterior a la infusión de los pacientes, cada una con la adición de IMAB362 (10,0 µg/ml) en (concentración CDC-EC*90-100* $_{\text{in vitro}}$).
- Anticuerpo control negativo del ensayo: Anticuerpo de control de isotipo diluido en una agrupación de de suero humano.

B. Resultados

Capacidad de las PBMC de los pacientes para mediar la ADCC

Para analizar la capacidad de las células inmunitarias del paciente para lisar células tumorales que expresan CLDN18.2, se incubaron células de cáncer gástrico NUGC-4, que expresaban CLDN18.2 endógenamente, con concentraciones crecientes de IMAB362 y con PBMC de pacientes. Los ensayos con PBMC de un donante sano se incluyeron como control funcional.

Las PBMC de los pacientes mostraron tasas de lisis dependiente de la dosis de IMAB362 con un máximo de 27 a 77 % a una concentración de ~30 µg/ml. Esto no es diferente significativamente (prueba t no pareada) de las tasas máximas de lisis de 14 a 56 % obtenidas con PBMC de controles sanos probados en los mismos ensayos (Figura 2). La actividad de ADCC fue más profunda para el paciente 0204.

Estos datos muestran que las PBMC de pacientes con cáncer gástrico no son inferiores en la inducción de ADCC de células de cáncer gástrico positivas para CLDN18.2 humanas junto con IMAB362 en comparación con las PBMC obtenidas a partir de donantes sanos.

Capacidad del sistema del complemento de los pacientes para inducir CDC

Se probó la capacidad del complemento del paciente para interactuar con el IMAB362 presente en el suero y para inducir CDC. A las muestras de suero anterior a la infusión se les añadió 0,5 µg/ml de IMAB362 fresco y la actividad de CDC se comparó con la misma concentración de anticuerpo añadido en la agrupación de suero humano. Se incubaron muestras de suero/anticuerpo con células CHO-K1 p740 luci # 2A5 y se determinó la lisis después de 80 minutos mediante la medición de la actividad luciferasa.

Todos los pacientes fueron capaces de inducir CDC significativa dentro de 80 minutos (Figura 3). Para 5 de 6 pacientes, se observaron tasas máximas de lisis que variaban del 50 al 71 %. Esto es comparable a los datos que obtuvimos mediante pruebas paralelas con suero agrupado de controles sanos (64,5 %). Cabe destacar que el paciente 0204 mostró la mayor actividad de CDC con IMAB362 fresco (93,9 %).

Capacidad de efectores solubles en el suero del paciente de inducir la muerte celular con IMAB362 que circula por vía intravenosa

A continuación, se investigó la capacidad del suero de los pacientes para interactuar con el IMAB362 administrado i.v. durante el período de su circulación en el paciente mediante el análisis de muestras de suero recolectadas en diferentes puntos temporales después de la administración de IMAB362 en ensayos de CDC en células objetivo CHO-K1 positivas para CLDN18.2. Las muestras de suero fueron la fuente de los efectores solubles específicos del paciente, lo que incluye el complemento, así como también, el IMAB362. Las concentraciones de IMAB362 en muestras de suero se determinaron mediante ELISA (vivoScience) (Tabla 8) y se ajustaron a una concentración final de IMAB362 de 0,5 µg/ml (mediana de EC50 de IMAB362) mediante el uso del suero anterior a la infusión correspondiente de cada paciente como diluyentes. Como las concentraciones de IMAB362 difieren en dependencia de la dosis de tratamiento y el punto temporal de recolección de sangre, el factor de dilución para las muestras difirió considerablemente entre pacientes con una variación de 4,6 veces a 688 veces. Se usó una agrupación de suero de donantes sanos (HSC) como control (Figura 4).

En comparación con el control positivo (suero anterior a la infusión del paciente respectivo + IMAB362 fresco), la actividad de destrucción se retiene dentro de las primeras 24 h, mientras que la actividad citolítica de las muestras de suero recolectadas una semana después disminuye, lo que progresa aún más en las semanas siguientes (Figura 4). Aun así, el suero de los pacientes ejecutó una citotoxicidad considerable incluso 2 semanas después de la administración de IMAB362. La pérdida en la actividad de CDC después de 28-32 días es significativa y más pronunciada en pacientes tratados con dosis bajas de IMAB362 (Figura 4). En pacientes tratados con dosis altas (0204; 600 mg/m^2 y 0205; 1000 mg/m^2) la actividad de CDC parecía conservarse mejor durante el período de tiempo investigado. Basado en los datos disponibles actualmente, el mecanismo subyacente para esta disminución no se entiende hasta ahora.

Tabla 8: Concentraciones de IMAB362 en suero del paciente en diferentes puntos temporales usados en los diferentes ensayos de ADCC y CDC. n.a. no disponible; n.d.: excluido, no determinado; [1]concentración medida mediante vivoScience a través de ELISA

Núm. de sujeto	Tratamiento con IMAB362	Tiempo después del tratamiento con IMAB362	Concentración de IMAB362 en suero de paciente sin diluir[1]	Factor de dilución para obtener 0,5 µg/ml de IMAB362 en ensayos de CDC	Concentración de IMAB362 en ensayos de citotoxicidad	Concentración de IMAB362 en ensayos de CDC no normalizados
	(mg/m^3)	(días)	[µg/ml]	(veces)	[µg/ml]	[µg/ml]
0201	33	1	11,17	22,34	2,79	2,2
		7	6,63	13,27	1,66	1,4
		14	5,30	10,60	1,32	1,1
		30	2,31	4,62	0,58	0,5
0202	100	1	41,37	82,74	10,34	8,3
		7	17,08	34,15	4,27	3,4
		14	12,78	25,56	3,16	2,6
		28	6,41	12,82	1,60	1,3
0203	100	1	36,58	73,17	9,15	7,3
		7	18,24	36,48	4,56	3,6
		14	12,63	25,26	3,16	2,5
		28	6,34	12,69	1,59	1,3
0403	300	1	113,40	227,91	28,49	22,8
		7	43,91	87,81	10,98	8,7
		14	20,97	41,95	5,24	4,2
		28	11,41	22,81	2,85	2,3
0204	600	1	340,38	680,76	85,10	68,1
		7	n,a,	n,a,	n,a,	n,a,
		14	87,53	175,06	21,88	17,5
		32	52,86	105,72	13,22	10,6
0205	1000	1	343,93	687,86	85,60	68,8
		7	155,28	310,56	38,82	31,1
		14	105,91	211,81	26,48	21,2
		30	38,92	77,84	9,73	7,8

Efecto de los componentes del suero sobre la citotoxicidad inducida por IMAB362

La actividad ADCC de los AcM puede afectarse en presencia de suero humano. Se investigó el efecto de los sueros de los pacientes sobre la actividad de ADCC. Con este objetivo, se usó el suero de cada paciente recolectado 7, 14 y 28-32 días después de la administración de IMAB362 y, por lo tanto, representa los factores del complemento del paciente más

el IMAB362 administrado i.v. circulante. Todas las muestras de suero de pacientes se diluyeron a concentración final de suero del 25 % (v/v) y se calculó la concentración de IMAB362 restante en cada muestra de ensayo del paciente (Tabla 8). Las PBMC de un donante sano se usaron como efectores y las células NUGC-4 como células objetivo (relación E:T = 40:1) en este ensayo de ADCC. Todos los ensayos para todos los pacientes se realizaron en paralelo en un solo experimento mediante el uso de las mismas condiciones, células objetivo y PBMC de donantes para garantizar la comparabilidad. Como control de ensayo funcional, a la agrupación de suero humano sano se le añadió IMAB362 (200,0 µg/ml). Como control positivo adicional, a las muestras de suero anterior a la infusión de pacientes individuales se les añadió IMAB362 200,0 µg/ml (que representa una $EC_{80-100\ in\ vitro}$ para IMAB362 en este sistema).

Observamos en todos los ensayos que los anticuerpos IMAB362 presentes en el suero del paciente después de la administración son altamente activos e inducen citotoxicidad (Figura 5). La actividad biológica de IMAB362 se mantuvo durante 28-32 días después de la administración, con destrucción específica aún superior al 48 % en todos los grupos de dosis. Las diferencias generales entre los grupos de dosis fueron sorprendentemente modestas, lo que sugiere un efecto de saturación. En pacientes tratados con dosis más bajas (33-300 mg/m^2) se observó una disminución moderada en la destrucción específica de 77,7-87,4 % a 48,3-66,8 % en el tiempo lo que se correlaciona con la disminución en las concentraciones de anticuerpo en el suero (Figura 5 panel superior). La mayor actividad mantenida de manera estable en el tiempo se observó en pacientes tratados con 600 o 1000 mg/m^2 de IMAB362 (Figura 5 panel inferior).
Este ensayo se repitió con muestras de suero, en las que los factores del complemento se inactivaron mediante incubación a 56 °C durante 30 min. La citotoxicidad con muestras de suero de pacientes inactivadas por calor fue menor en comparación con las obtenidas con muestras de suero no tratadas en todos los casos. Además, se observaron disminuciones similares con la agrupación a partir de donantes sanos inactivada por calor (HSC, Figura 6).

En resumen, estos datos indican que el suero del paciente no inhibe la capacidad de ADCC de los componentes solubles del suero, sino que se suma a la actividad citolítica total inducida por IMAB362.

Cinética de la CDC mediada por IMAB362 en suero de pacientes

Para determinar la cinética de la capacidad de CDC de IMAB362 en suero de pacientes de los diferentes grupos de dosis, se recolectaron muestras de suero 1, 7, 14 y 28 días después de la administración de IMAB362.

Una vez más, este suero sirvió como fuente de complemento, así como también para IMAB362. Las concentraciones séricas finales se ajustaron al 20 % (v/v) del volumen final. Las concentraciones finales de IMAB362 en cada muestra de ensayo de CDC se enumeran en la Tabla 7. Como control positivo, a las muestras anteriores a la infusión del paciente se les añadió el anticuerpo IMAB362 fresco a una concentración final de 10 µg/ml ($EC_{95\ in\ vitro}$ de IMAB362 en este sistema de ensayo de CDC). Además, para el control funcional del ensayo de CDC, se prepararon diluciones en serie de IMAB362 (0,032-10 µg/ml) en una agrupación de suero humano. Se usó un ensayo estandarizado con células CHO-K1 transfectadas de manera estable con CLDN18.2 y luciferasa como células objetivo. Todas las muestras de suero se descongelaron y analizaron en paralelo en el mismo experimento.

La actividad de CDC se correlaciona bien con la concentración de anticuerpos en cada muestra de suero (Figura 7). Lo que es más importante, los datos sugieren que la actividad de citotoxicidad mediada por CDC se mantiene durante 4 semanas. En particular, los pacientes de los grupos de dosis altas no muestran caída de la actividad de CDC durante este tiempo.

Resumen y conclusiones

Los pacientes con GEC parecen no afectarse en su capacidad para inducir tanto ADCC como CDC de las células objetivo que expresan CLDN18.2 junto con IMAB362. Cabe destacar que la lisis específica máxima observada en ADCC y CDC y la EC_{50} medida para ADCC fueron más altas para el paciente 0204, que tuvo la respuesta de antígeno tumoral sérico y clínico más prominente.

El análisis ex vivo de CDC con el IMAB362 circulante en diferentes puntos temporales después de su administración mostró que aún 2 semanas después de la administración hay suficiente IMAB362 activo en circulación en los pacientes para inducir ADCC y CDC profundas.

La actividad de CDC de los pacientes junto con IMAB362 circulante se reduce en el tiempo por razones desconocidas hasta ahora.

Ejemplo 3: Citocinas

Los niveles séricos de citocinas pueden servir como indicadores del estado inmunitario de un paciente. En este ensayo clínico, el objetivo de analizar las citocinas fue principalmente para respaldar el monitoreo de la seguridad. Revisamos las citocinas dentro de este análisis auxiliar desde el punto de vista de la definición de posibles candidatos a biomarcadores.

Los niveles de citocinas se determinaron el día 1 anterior a la infusión de IMAB362 y en los días 3 y 5 del ciclo de tratamiento. Las citocinas estudiadas comprenden citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, IFNγ, TNFα) y

antiinflamatorias (IL-4, IL-10) y citocinas necesarias para el crecimiento y la función de las células T (IL-2) y proliferación de células NK (IL-2, IL-15).

Las citocinas se analizaron mediante ELISA y citometría de flujo (Interlab). Las citocinas se analizaron de acuerdo con Interlab SOP-MU-IMM.M.0144. 05 "Flow Cytomix Cytokin- Check IL4, IL6, IL13, TNF-alfa, IFN-gamma, MCP-1, IL10 IL2, IL1-β, IL12p70, IL8, IL17A, IL23" y SOP-MU-IMM.M.0151.02 "Humanes Interleukin 15".

Se analizaron los niveles séricos de citocinas de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IFNγ y TNFα para 14 de 15 pacientes (Tabla 9). No se determinaron los niveles de citocinas para el paciente 0403 (300 mg/m^2). Solo los valores de los niveles de citocinas en suero, que estaban por encima del intervalo de referencia, se analizaron para detectar cambios temporales. Los valores del intervalo de referencia se definieron mediante Interlab (ver CSR GM-IMAB-001).

Tabla 9: Niveles séricos de citocinas en el día 1, día 3 y día 5

Los niveles séricos de citocinas de todos los pacientes se midieron en el día 1, el día 3 y el día 5. Se indica el intervalo de referencia para cada citocina. Los valores por debajo o por encima del límite de detección se ajustaron con respecto al límite de detección respectivo para los cálculos.															
Paciente	**0103**	**0104**	**0201**	**0105**	**0202**	**0203**	**1101**	**1201**	**0204**	**0302**	**1202**	**0106**	**0112**	**0205**	
Dosis [mg/m²]	**33**					**100**	**300**		**600**			**1000**			
(Intervalo de referencia [pg/ml])	**Día**	**Citocinas proinflamatorias [pg/ml]:**													
IL-1 (<5,2)	**1**	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	11,7	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
	3	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
	5	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2	<4,2
IL-6 (<4,5)	**1**	<1,2	<1,2	<1,2	10,7	<1,2	8,3	<1,2	2,6	6,4	4,2	2,8	<1,2	16	4,2
	3	<1,2	25,7	<1,2	5,2	<1,2	5,9	<1,2	2,6	123	4,2	12,5	<1,2	<1,2	2,8
	5	<1,2	11,6	<1,2	5,2	<1,2	7,5	5,3	<1,2	27,9	4,2	23,4	<1,2	<1,2	5,6
IL-12 (<11,6)	**1**	<1,5	<1,5	3,9	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
	3	<1,5	<1,5	3,9	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
	5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5
IFNγ (<45,0)	**1**	<1,6	<1,6	182	<1,6	<1,6	26,2	30,7	<1,6	<1,6	<1,6	81,2	<1,6	<1,6	35,9
	3	<1,6	<1,6	173	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
	5	<1,6	<1,6	71,8	<1,6	<1,6	<1,6	3,5	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6	<1,6
TNFα (<17,5)	**1**	<3,2	<3,2	29,8	<3,2	<3,2	10,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
	3	<3,2	<3,2	15,7	<3,2	<3,2	4,6	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
	5	<3,2	<3,2	10,1	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2	<3,2
Citocinas antiinflamatorias [pg/ml]:															
IL-4 (20,8)	**1**	<20,8	<20,8	57,1	<20,8	28,1	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8
	3	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	21,2	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8
	5	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	28,1	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8	<20,8

(continuación)

IL-10 (<6,0)	**1**	20,7	27,3	38,1	<6,0	20,7	14,1	9,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
	3	19,4	23,3	28,6	<6,0	22,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
	5	20,7	27,3	23,3	<6,0	22,0	<6,0	13,6	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0	<6,0
Citocinas para la función y proliferación de células T y células NK [pg/ml]:															
IL-2 (<20,0)	**1**	<16,4	<16,4	354	<16,4	55,3	45,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	42,8	<16,4	<16,4	42,8
	3	17,3	<16,4	259	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4
	5	<16,4	<16,4	162	<16,4	<16,4	<16,4	71,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4	<16,4
IL-15 (<3,0)	**1**	<3,0	698	<3,0	<3,0	51	<3,0	<3,0	18,3	<3,0	<3,0	23,1	<3,0	<3,0	<3,0
	3	<3,0	646	<3,0	<3,0	43	<3,0	<3,0	18,3	<3,0	<3,0	14,7	<3,0	<3,0	<3,0
	5	<3,0	582	<3,0	<3,0	47,7	<3,0	<3,0	11,7	6,0	<3,0	10	<3,0	<3,0	<3,0

Los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12, IFNγ, TNFα) estaban por encima de los intervalos de referencia respectivos en 9 de 14 pacientes (0104, 0105, 0201, 0203, 0204, 0112, 1202, 0112, 0205). Los niveles de IFNγ se elevaron en dos pacientes (0201, 1202), el nivel de TNFα se elevó en uno de estos dos pacientes (0201). En ambos pacientes, los niveles de IFNγ y TNFα se elevaron antes de la administración de IMAB362 y disminuyeron en los días siguientes. Los niveles de IL-6 se elevaron en ocho pacientes (0104, 0105, 0203, 1101, 0204, 0112, 1202, 0205). No se evidenció un patrón claro en los cambios de nivel de IL-6 con respecto a la administración de IMAB362 y la relación dosis-efecto. Los niveles de IL-6 del paciente 0204 (600 mg/m^2 de IMAB362) no se elevaron antes de la administración pero aumentaron considerablemente 2 días después de la infusión, un patrón que ningún otro paciente mostró. Los niveles de IL-1 e IL-12 se mantuvieron dentro del intervalo de referencia respectivo para todos los pacientes.

Los niveles de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10) estuvieron por encima del intervalo de referencia respectivo en 6 de 14 pacientes (0103, 0104, 0201, 0202, 0203, 1101). Los niveles de IL-10 se elevaron en seis pacientes (0103, 0104, 0201, 0202, 0203, 1101), los niveles de IL-4 se elevaron en dos de estos pacientes (0201, 0202). Las fluctuaciones de los niveles de citocinas antiinflamatorias no muestran un patrón claro con respecto a la administración de IMAB362 y la relación dosis-efecto.
Las citocinas para la función y proliferación de células T y células NK y los niveles de IL-2 e IL-15 estuvieron por encima del intervalo de referencia respectivo en 9 de 14 pacientes (0104, 0201, 0202, 0203, 1101, 1201, 0204, 1202, 0205). Los niveles de IL-2 estuvieron por encima del intervalo de referencia en seis pacientes (0201, 0202, 0203, 1101, 1202, 0205), los niveles de IL-15 estuvieron por encima del intervalo de referencia en cinco pacientes (0104, 0202, 1201, 0204, 1202). Siete de nueve pacientes (0104, 0201, 0202, 0203, 1201, 1202, 0205) con niveles elevados de IL-2/IL-15 antes de la administración mostraron una disminución del nivel de citocinas en los días siguientes: Los niveles de IL-2/IL-15 estuvieron por encima del intervalo de referencia respectivo antes de la administración de IMAB362 y disminuyeron en el segundo y cuarto día después de la administración de IMAB362. La disminución más pronunciada en este grupo se observó para las concentraciones séricas de IL-2. En todos los cinco pacientes (0201, 0202, 0203, 1202, 0205) con niveles de IL-2 aumentados anteriores a la infusión, se observó una disminución a menos del 50 % de los niveles anteriores a la infusión respectivos en el cuarto día después de la administración. Esta disminución pudo observarse, además, en un paciente (0201) con un nivel de IL-2 elevado considerablemente (354 pg/ml) antes de la administración de 33 mg/m^2 de IMAB362.

El paciente 1101 mostró un perfil de concentración de IL-2 diferente (300 mg/m^2 de IMAB362) con niveles de IL-2 en el intervalo de referencia anterior a la infusión y 2 días después, pero la concentración de IL-2 se elevó al cuarto día después de la infusión.

El nivel de IL-15 disminuyó al cuarto día después de la administración en todos los cuatro pacientes (0104, 0202, 1201, 1202) con niveles elevados de IL-15 anteriores a la infusión. Este perfil de concentración es muy similar al perfil de concentración de IL-2 observado, aunque la disminución del nivel relativo no es tan pronunciada.

No puede discernirse una relación dosis-efecto para ninguna de las citocinas analizadas.

Para resumir lo anterior, el análisis de los niveles de previos al tratamiento de los pacientes mostró que IL-6, IL-10, IL-2, IL-15 se elevan en una fracción sustancial de pacientes en etapa tardía con enfermedad gastroesofágica. Por el contrario, ninguno o solo pacientes individuales tenían niveles elevados de IL-1, IL-12, IL-4, IFNγ y TNFα.

El análisis de la alteración de los niveles de citocinas dentro de los primeros 5 días después del tratamiento con IMAB362 condujo a las observaciones siguientes. En todos los cinco pacientes con niveles elevados de IL-2, estos niveles disminuyeron profundamente, con cuatro de cinco pacientes que alcanzaron valores de referencia normales. De manera similar, en los cuatro pacientes con niveles elevados de IL-15 se observó una disminución moderada después de la administración de IMAB362. La disminución de los niveles elevados después del tratamiento se observó, además, en pacientes individuales con niveles elevados de IFNγ y TNFα, respectivamente. La IL-6, por el contrario, aumentó después de la administración de IMAB362, con cuatro pacientes antes del tratamiento y 7 de 14 pacientes en el día 5 después del tratamiento, que mostraron IL-6 por encima de los niveles de referencia.

Ejemplo 4: Estudio internacional, multicéntrico, sin enmascaramiento, fase IIa, de dosis múltiples que evalúa la eficacia y seguridad de dosis múltiples de IMAB362 en pacientes con adenocarcinoma avanzado de estómago o esófago inferior

Se realizó un estudio internacional, multicéntrico, sin enmascaramiento, fase IIa, de dosis múltiples para investigar la eficacia y seguridad de dosis múltiples de IMAB362 en pacientes con adenocarcinoma avanzado de estómago o esófago inferior. El objetivo principal de este estudio fue estudiar la tasa de remisión (CR, PR) de acuerdo con RECIST. Los objetivos secundarios de este estudio fueron: frecuencia y gravedad de los eventos adversos de acuerdo con CTCAE v3.0 y tolerabilidad de dosis múltiples de IMAB362, tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS): El tiempo desde el comienzo de la primera infusión hasta la fecha de la primera progresión de la enfermedad o muerte observada debido a cualquier causa (cualquiera que se produjera primero), inmunogenicidad mediante análisis de anticuerpos anti-quiméricos humanos, calidad de vida, beneficio clínico (CR, PR y SD de acuerdo con RECIST), y farmacocinética de IMAB362 por niveles séricos.

Los pacientes se sometieron a tamizaje para determinar la presencia en su tumor de la CLDN18.2 objetivo del IMAB362. El estado de CLDN18.2 se determinó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-claudina-18, que se realiza de

acuerdo con un protocolo estandarizado. Los pacientes con tumores donde al menos el 50 % de las células se tiñeron con al menos intensidad de tinción 2 + (intensidad doble) se inscribieron en este ensayo. Los criterios de inclusión y exclusión se verificaron durante la visita de tamizaje (V1). Los pacientes se reclutaron a partir de hospitales universitarios especializados en el tratamiento del cáncer gastroesofágico.

Los pacientes tenían que cumplir con todos los criterios de inclusión siguientes:

- Enfermedad metastásica, refractaria o recurrente de adenocarcinoma avanzado de estómago o esófago inferior comprobada mediante histología
- Expresión de CLDN18.2 confirmada por inmunohistoquímica en muestra de tejido tumoral embebida en parafina en al menos 50 % de las células tumorales con una intensidad de tinción de al menos 2+ (en una escala de 0 a 3+)
- Al menos 1 sitio medible de la enfermedad de acuerdo con los criterios RECIST (barridos de CT o MRI no más antiguos que 2 semanas antes de la visita 2)
- Edad ≥ 18 años
- Consentimiento informado por escrito
- Estado funcional ECOG (PS) 0-1 o índice de Karnofsky 70-100 %
- Esperanza de vida > 3 meses
- Recuento de plaquetas ≥ 100 000/mm^3
- Hemoglobina ≥ 10 g/dl
- Bilirrubina normal
- AST y ALT < 2,5 veces el límite superior del normal (ULN) (5 veces ULN si se presentan metástasis hepáticas)
- Creatinina < 1,5 x ULN
- Para mujeres con maternidad potencial (última menstruación menos de 2 años antes de la inscripción): Prueba de embarazo negativa (β-HCG) al inicio del estudio y mediante el uso de dos métodos anticonceptivos altamente eficaces durante la fase de tratamiento y durante 8 semanas después de la última infusión del fármaco del estudio
- Los pacientes masculinos cuyas parejas sexuales eran mujeres con maternidad potencial tuvieron que usar un método anticonceptivo aceptado durante la fase de tratamiento y durante 8 semanas después de la última infusión del fármaco del estudio

Los pacientes que cumplían uno o más de los criterios de exclusión siguientes no eran elegibles para ingresar al estudio:

- Embarazo o lactancia
- Reacción alérgica grave anterior o intolerancia a un anticuerpo monoclonal, lo que incluye anticuerpos humanizados o quiméricos
- Menos de 3 semanas desde la quimioterapia o radioterapia anteriores
- Otros agentes o dispositivos de investigación simultáneamente o dentro de las 4 semanas anteriores a este estudio
- Otras terapias simultáneas contra el cáncer (no para la indicación bajo el tratamiento del estudio)
- Infección por VIH conocida o hepatitis activa conocida (A, B, C)
- Anticoagulación simultánea con antagonistas de la vitamina K (por ejemplo, Coumadin, Marcumar)
- Dosis terapéuticas de heparina (se aceptan dosis profilácticas)
- Enfermedades no controladas que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las siguientes:
  - Infección continua o activa que requiere antibióticos parenterales
  - Insuficiencia cardíaca congestiva sintomática
  - Angina de pecho inestable
  - Hipertensión no controlada
  - Arritmia cardíaca significativa clínicamente
  - Infarto de miocardio dentro de los últimos 6 meses
  - Sangrado gástrico dentro de las últimas cuatro semanas
  - Úlcera péptica sintomática
  - Síntomas clínicos de metástasis cerebral
- Enfermedades psiquiátricas o situaciones sociales que impedirían el cumplimiento del estudio

Todos los pacientes de todas las cohortes recibieron dosis repetidas de IMAB362 cada dos semanas en las visitas 2, 5, 6, 7 y 8 (5 aplicaciones). El procedimiento de escalado de dosis comprendió las cohortes siguientes con dos dosis diferentes (anticuerpo/área de superficie corporal) de IMAB362:

Cohorte 1:	300 mg/m^2
Cohorte 2:	600 mg/m^2
Cohorte 3:	600 mg/m^2

La solución de anticuerpo se administró como una infusión intravenosa de 2 h cada dos semanas. Era importante que el tiempo de infusión no fuera inferior a 2 horas. Para la infusión, tuvo que usarse un sistema de infusión (por ejemplo, Infusomat® fmS) para controlar el tiempo de infusión. El conjunto de infusión suministrado con el fármaco del estudio,

cuya compatibilidad se probó por el fabricante, tuvo que usarse para la aplicación del fármaco. El momento de la infusión del fármaco del estudio tenía que ser en la mañana. Un médico calificado tenía que estar disponible en el momento durante la infusión y 24 horas después.

Treinta y siete pacientes recibieron al menos un tratamiento. Desafortunadamente para 3 de ellos, la documentación no estaba completa en la base de datos, por lo que 34 pacientes se incluirán en el conjunto de todos los pacientes tratados (conjunto APT) y se usarán para el análisis de seguridad. Cuatro, 6 y 24 pacientes se asignaron respectivamente a la cohorte 1 con 300 mg/m^2 de IMAB362, cohorte 2 con 600 mg/m^2 de IMAB362 y cohorte 3 con 600 mg/m^2 de IMAB362.

Durante la fase de tratamiento, un paciente de la cohorte 1, tres pacientes de la cohorte 2 y 12 pacientes de la cohorte 3 interrumpieron el estudio antes de recibir 5 infusiones de IMAB362 y completar la visita 9 (lo que incluye la segunda obtención de imagen del tumor) dos semanas después de la 5ta infusión. Estos pacientes se han reemplazado.

Dos pacientes en la cohorte 2 no tenían enfermedad medible al inicio y se excluyeron del análisis de eficacia. Se presentaron desviaciones menores del protocolo, tales como la evaluación del tumor inicial > 14 días antes de la Visita 2 (n = 3; 8,8 %), hemoglobina < 10 g/dl (n = 5; 14,7 %), valores anormales de bilirrubina (n = 3, 8,8 %), ALT o AST > 2,5 ULN (> 5 ULN en caso de metástasis hepáticas) (n = 2; 5,9 %), un valor para creatinina > 1,5 ULN (n = 1; 2,9 %) y ventanas de tiempo prolongadas (> 15 días) entre el período de tamizaje y el comienzo del tratamiento (n = 2; 5,9 %), pero no condujeron a la exclusión de ningún análisis. Un paciente tuvo un infarto de miocardio dentro de los últimos 6 meses. Se le otorgó la dispensa.

Como en las cohortes 2 y 3 los pacientes recibieron la misma dosis de 600 mg/m^2, se decidió analizar a estos pacientes como un solo grupo. Todos los pacientes (n = 34) del conjunto APT eran caucásicos. La mediana de la edad fue de 62 (intervalo de 45-65 años) en el grupo de dosis de 300 mg/m^2 y 61 (intervalo de 42-77 años) en el grupo de dosis de 600 mg/m^2.

En la Tabla 10 se muestra una visión general de la localización del cáncer y el resultado de la clasificación histopatológica. La mediana del período de tiempo entre el primer diagnóstico y la visita de tamizaje para este estudio fue de 16 meses (mínimo 2,7/máximo 56). El estado de expresión de HER2/neu era mayormente desconocido para los pacientes, excepto para 5 pacientes tratados con 600 mg/m^2. Uno de estos 5 pacientes era positivo para HER2/neu.
La clasificación TNM se especificó para el cáncer de estómago (n = 16) y el esófago o la unión gastroesofágica (n = 19). En el conjunto APT, el 25 % de los pacientes se presentaron con tumores primarios del estómago clasificados con T1 o 2, el 31 % se presentaron con T3, el 25 % con tumores primarios T4 y el 19 % era desconocido. El sesenta y nueve (69) % de los pacientes en el conjunto APT tenían al menos uno o dos ganglios linfáticos infiltrados indicados por la clasificación N1 y el 56 % de los pacientes sufrían metástasis periféricas (M1) en el momento del diagnóstico. El sesenta y nueve (69) % de los pacientes con cáncer de esófago o unión gastroesofágica se diagnosticaron con ≥ T3. Al menos uno o dos ganglios linfáticos infiltrados (Nl) se informaron para el 84 % de los pacientes. Además, el 84 % de los pacientes se presentaron con metástasis periféricas.

Tabla 10: Visión general de la localización y el tipo de tumor en el primer diagnóstico

(Un paciente tenía cáncer de esófago y estómago; varios pacientes tenían cáncer de estómago que afectaba a diferentes partes del estómago)			
	300 mg/m^2 N (%)	600 mg/m^2 N (%)	Conjunto APT N (%)
Número de pacientes	4	30	34
Esófago	-	2 (6,7)	2 (6,7)
Unión Gastroesofágica	1 (25,0)	16 (53,3)	17 (50,0)
distal	-	4	4
cardias	-	8	8
subcardias	1	2	3
sin especificar	-	2	2
Estómago	3 (75,0)	13 (43,3)	16 (47,1)
fondo	-	2	2
cuerpo	-	6	6
antro	-	3	3

píloro	-	-	-
sin especificar	3	6	9
Tipo de tumor			
intestinal	-	8	8
difuso	1	6	7
CA de células en anillo de sello	-	4	4
mezclado	-	1	1
sin especificar	3	12	15
Clasificación histopatológica			
G2	-	10	10
G2-3	1	2	3
G3	1	14	15
G3-4	-	1	1
Desconocido	2	3	5

Sobre la base de MedDRA SOC, las enfermedades anteriores relevantes clínicamente más frecuentes fueron los procedimientos quirúrgicos en 25 pacientes (73,5 %), la quimioterapia en 30 pacientes (88,2 %) y la radiación en 7 pacientes (79,4 %). En la mayoría de los casos, la cirugía consistió en la extirpación quirúrgica de órganos (como gastrectomía (72 %), esofagectomía (16 %), linfadenectomía (32 %), colecistectomía (20 %)). Todos los pacientes, excepto cuatro, tenían al menos una terapia anterior para su enfermedad de estudio. Sobre la base de DD ATC de la OMS, los fármacos usados con mayor frecuencia fueron análogos de pirimidina (fluorouracilo y/o capecitabina), compuestos de platino (cisplatino y/u oxaliplatino) y agentes detoxificantes para el tratamiento antineoplásico (folinato de calcio y/o ácido folínico). Además, se documentaron otros tratamientos medicinales anteriores (que finalizaron el día de la infusión a más tardar).

Un total de 30 de los 34 pacientes (88,2 %) tenían al menos una enfermedad concomitante, es decir, una enfermedad que estaba en curso el día de la infusión de la medicación del estudio. Sobre la base de MedDRA SOC, los diagnósticos más comunes fueron 'trastornos gastrointestinales' en 19 pacientes (56 %), 'trastornos generales' en 12 pacientes (35 %), 'trastornos del metabolismo y la nutrición' en 10 pacientes (29 %) y 'trastornos musculoesqueléticos y del tejido conectivo' en 8 pacientes (23,5 %). Las terapias concomitantes fueron principalmente fármacos para trastornos relacionados con la acidez (17 pacientes; 50 %), analgésicos (12 pacientes; 35,3 %) y medicamentos para trastornos GI (10 pacientes; 29,4 %).

A. Evaluación de seguridad

Debido a que las inyecciones de la medicación del estudio se administraron por los investigadores en los centros de estudio y los pacientes tuvieron que permanecer en el hospital para la observación durante al menos 24 horas y hasta 72 horas, se garantizó el cumplimiento general de acuerdo con el protocolo del estudio. La asignación de los sujetos elegibles a las cohortes de dosis se realizó exactamente como se especificó por el protocolo del estudio (supervisado por el DSMB). La duración del estudio, definida como el tiempo desde la fecha de la visita de tamizaje parte 1 hasta el último día del estudio, varió desde un mínimo de 18 días hasta un máximo de 355 días. La mediana de la duración del estudio fue de 106 días. 16 pacientes terminaron el estudio prematuramente antes de la visita objetivo 9. Los pacientes en todos los grupos de dosis tuvieron una mediana de 4,5 a 5 infusiones de IMAB362. La mediana de la duración de una infusión de IMAB362 en el conjunto APT fue de 125 minutos. Hubo un paciente con una duración inferior a los 120 minutos especificados en el protocolo. Este paciente interrumpió la perfusión debido al vómito y suspendió prematuramente el estudio.

El análisis de seguridad se llevó a cabo para el conjunto APT que comprende los 34 pacientes que recibieron al menos una dosis de 300 mg/m^2 (n = 4) o 600 mg/m^2 (n = 30). Doscientos cuarenta y un (241) eventos adversos según la descripción del médico se codificaron de acuerdo con el diccionario MedDRA y se tradujeron a los términos preferidos. Los eventos adversos de acuerdo con los términos preferidos se contaron solo una vez para cada paciente (también si el mismo evento adverso ocurrió más de una vez para ese paciente durante el estudio). Se registró el grado más alto de NCI-CTC que ocurrió en cada paciente. Treinta y dos (32, 94 %) pacientes tuvieron al menos un evento adverso (independientemente de la relación) durante el estudio. No se documentaron eventos adversos para 2 pacientes. En general, 6 pacientes (18 %) no experimentaron un evento adverso relacionado posiblemente con el medicamento. Se informaron ciento cuatro (104) eventos adversos relacionados con el fármaco según los términos preferidos para 28 pacientes. Ocho (8) eventos adversos graves posiblemente relacionados con el fármaco se reportaron para 4 pacientes.

El número de pacientes en el grupo de dosis más baja (300 mg/m^2) era demasiado pequeño para permitir una comparación detallada entre ambos grupos de dosis. La incidencia de pacientes con eventos adversos relacionados en la cohorte de 300 mg/m^2 y en el grupo de 600 mg/m^2 (cohorte 2 y 3) son de 75 y 83 %, respectivamente.

En total, los AE de los SOC 'trastornos gastrointestinales' (27/34 pacientes, 79,4 %), 'trastornos generales y condiciones del sitio de administración' (26/34 pacientes, 76,5 %) se informaron con mayor frecuencia. Sobre la base de MedDRA PT, los AE documentados con mayor frecuencia fueron 'náuseas' (57 eventos en 18 pacientes), 'vómitos' (52 eventos en 16 pacientes) y 'fatiga' (20 eventos en 14 pacientes). En total, solo 192 de los AE registrados se evaluaron por los investigadores en relación con la medicación del estudio. Estos AE relacionados con el tratamiento se clasificaron en 104 términos preferidos diferentes y se observaron en 28/34 pacientes.

La mayoría de los eventos adversos relacionados fueron leves a moderados. Hubo 8 (23,5 %) pacientes con eventos emergentes del tratamiento relacionados con el fármaco moderados y 12 (35,3 %) pacientes con eventos emergentes del tratamiento relacionados graves.

Se informaron AE relacionados con el fármaco de intensidad severa para 2 pacientes en el grupo de dosis de 300 mg/m^2, vómitos y en un paciente concomitantes con náuseas. En el grupo de dosis de 600 mg/m^2 10 pacientes experimentaron eventos adversos graves relacionados con el fármaco, 6 pacientes con vómitos de los cuales 3 pacientes experimentaron, además, náuseas, un paciente con hipersensibilidad (reacción alérgica), un paciente con hipersecreción salival, un paciente con deshidratación y un paciente con hipoalbuminemia. Los dos últimos pacientes también informaron vómitos y náuseas. Dos pacientes sufrieron una hipersensibilidad relacionada (reacción alérgica) durante la infusión del fármaco del estudio, una de las cuales se clasificó como moderada y la otra como grave. Ambos pacientes se recuperaron después de detener la infusión.

En todos los eventos emergentes del tratamiento informados del estudio se necesitó acción farmacológica para 12/34 pacientes debido a un AE. En 7 (21 %) casos, un AE condujo a la interrupción permanente del estudio. El evento adverso subyacente se relacionó con el fármaco en 3 (hipersensibilidad (reacción alérgica) (n = 2), vómitos y dolor abdominal) y no se relacionó con el fármaco en los otros cuatro pacientes (deterioro general de la salud física (n = 3), neumonía). En un paciente la dosis se redujo y en otro paciente la administración de la dosis se retrasó 4 días debido a vómitos graves con náuseas. En tres pacientes, la infusión se interrumpió/prolongó. Veintisiete pacientes (79 %) recibieron terapia concomitante debido a un AE. Once pacientes se hospitalizaron.

Hubo 13 pacientes con 31 SAE documentados. Un paciente falleció durante la segunda fase de tamizaje del estudio. Doce pacientes tuvieron otros eventos adversos graves, que estaban relacionados con el fármaco del estudio en cuatro pacientes. Los investigadores consideraron que los vómitos, las náuseas y los eventos adversos relacionados, como la hemorragia GI y la exiccosis, se relacionaban con la medicación del estudio. Existieron 4 SAR y 2 SUSAR (vómitos y vómitos con hemorragia GI) en el presente estudio. El resultado final fue la muerte en siete casos. Los investigadores no clasificaron ninguna de las muertes como relacionadas con la medicación del estudio.

Un paciente era un varón caucásico de 45 años en buen estado general (estado funcional ECOG grado 1, índice de Karnofsky 80 %) con un estado dietético delgado (BMI 19,3).
El paciente recibió infusiones con 300 mg/m^2 de IMAB362 cada dos semanas el 4 de noviembre, el 22 de noviembre y el tercero el 6 de diciembre de 2011. Antes del estudio, el paciente ya había sufrido náuseas y vómitos de grado 1. El 7 de noviembre de 2010 se diagnosticó con vómitos de grado 3. Como se evaluó como grave, el paciente tuvo que ser hospitalizado. Cuando el vómito cambió al grado 1 el 17 de noviembre de 2010 y finalmente se detuvo por completo, el paciente pudo ser dado de alta del hospital el mismo día. Antes de la segunda y tercera infusión de IMAB362, el paciente se trató con una potente medicación anterior (alizaprida, aprepitant, metoclopramida, dimehidrinato) como profilaxis para las náuseas y los vómitos, de modo que no volvió a sufrir náuseas o vómitos. El investigador evaluó los vómitos como relacionados con el fármaco del estudio. El informe se recibió por el patrocinador el 19 de enero de 2011 y se juzgó el SAE como no esperado pero relacionado con el fármaco del estudio y, por lo tanto, se informó como un SUSAR.

Un paciente era un varón caucásico de 77 años. Se encontraba en muy buena condición general (estado funcional ECOG: grado 0, índice de Karnofsky: 100 %) con un estado dietético normal (BMI 24) en el tamizaje. Antes del estudio, el paciente ya padecía náuseas y, por lo tanto, se le trató según necesitaba con metoclopramida. El paciente recibió solo una aplicación de 600 mg/m^2 de IMAB362 el 9 de noviembre de 2011, ya que el estudio tuvo que suspenderse prematuramente debido a la muerte. Se diagnosticó un derrame pleural en el pulmón izquierdo mediante rayos X antes de la infusión y se informó como SAE. A la mañana siguiente, comenzó la hematemesis. Después de la administración de pantoprazol y 8 mg de ondansetrón i.v., el vómito disminuyó y la hematemesis se recuperó el mismo día. Los vómitos disminuyeron de grado 3 a grado 2 y finalmente se detuvieron el 12 de noviembre de 2011, por lo que el paciente pudo ser dado de alta del hospital el 13 de noviembre de 2011. El investigador evaluó el evento como relacionado con el fármaco del estudio. El patrocinador recibió el informe el 10 de noviembre de 2011 y el evento se juzgó como no esperado pero relacionado con el fármaco del estudio y, por lo tanto, se informó como SUSAR. La condición general del paciente empeoró, desarrolló insuficiencia renal y desafortunadamente falleció el 6 de diciembre de 2011.

Un paciente era un varón caucásico de 42 años en muy buena condición general (estado funcional ECOG grado 0; índice de Karnofsky: 100 %) con un estado dietético bien alimentado (BMI 26). El paciente recibió dos infusiones de 600 mg/m^2

de IMAB362. El 20 de marzo de 2012, el paciente recibió la primera aplicación del fármaco del estudio. Como sufría de náuseas y vómitos graves, la tasa de infusión tuvo que reducirse después de 35 minutos de infusión. Los síntomas se trataron con 40 mg de pantoprazol y 3 mg de granisetrón y 2 frascos de butilescopolamina i.v. y 80 mg de aprepitant i.v. Este evento adverso grave condujo a una hospitalización prolongada. El investigador evaluó este evento como relacionado con el fármaco del estudio. El patrocinador recibió el informe del SAE el 21 de marzo de 2012 y el evento se juzgó como esperado y relacionado con el fármaco del estudio. Pocos días después, el 24 de marzo de 2012, el paciente tuvo que ser hospitalizado nuevamente debido a una deshidratación grave, causada por náuseas y vómitos. Además, el paciente sufría de dolor en el epigastrio. Recibió 1 g de metamizol i.v., un parche de buprenorfina e infusiones para rehidratación. El 30 de marzo de 2012, los síntomas se aliviaron y el paciente se rehidrató. El investigador evaluó este evento como no relacionado con el fármaco del estudio. El patrocinador recibió el informe del SAE el 26 de marzo de 2012 y el evento se juzgó como no esperado y no relacionado con el fármaco del estudio. El 3 de abril de 2012, el paciente recibió la segunda infusión, que condujo de nuevo a los AE náuseas y vómitos. Se trató con 30 gotas de metoclopramida p.o. y 1 frasco de dimenhidrinato i.v. Como los síntomas empeoraron el 5 de abril de 2012, se evaluaron como graves. Además, el paciente tenía problemas de disfagia y, por lo tanto, redujo fuertemente la ingesta de alimentos. El 15 de abril de 2012, los síntomas desaparecieron. El investigador evaluó este evento como relacionado con el fármaco del estudio. El patrocinador recibió el informe del SAE el 19 de abril de 2012 y el evento se juzgó como esperado y relacionado con el fármaco del estudio.

Un paciente era un varón caucásico de 73 años en buena condición general (estado funcional ECOG grado 1; índice de Karnofsky: 90 %) con un estado dietético bien alimentado (BMI 26). Desde el 8 de noviembre de 2011 hasta el 3 de enero de 2012, el paciente recibió las cinco aplicaciones de medicamentos del estudio planificadas de 600 mg/m^2 de IMAB362 cada dos semanas. El 8 de noviembre de 2011, el paciente recibió la primera aplicación de IMAB362. Durante y después de esta infusión, sufrió náuseas y vómitos. Los síntomas se agravaron el 9 de noviembre de 2011. Después del tratamiento con metoclopramida, los síntomas se resolvieron un día después. El investigador evaluó el evento como relacionado con el fármaco del estudio. El patrocinador recibió el informe del SAE el 10 de noviembre de 2011 y el evento se consideró esperado y relacionado con el fármaco del estudio. El 6 de diciembre de 2011 fue la tercera infusión. El paciente sufrió de vómitos moderados y náuseas leves tratadas con clemastina, ranitidina y ondansetrón. El vómito duró un día. Las náuseas continuaron durante 7 días. El estudio finalizó el 16 de enero de 2012 debido a la progresión de la enfermedad. No se realizó visita de seguimiento.

En conclusión, se descubrió que el IMAB362 es seguro y bien tolerado en una población de pacientes tratados previamente con adenocarcinoma avanzado de estómago, esófago o unión gastroesofágica. En total, los AE de los SOC 'trastornos gastrointestinales' (27/34 pacientes, 79,4 %), 'trastornos generales y condiciones del sitio de administración' (26/34 pacientes, 76,5 %) se informaron con mayor frecuencia.

Sobre la base de MedDRA PT, los AE documentados con mayor frecuencia fueron 'náuseas' (57 eventos en 18 pacientes), 'vómitos' (52 eventos en 16 pacientes) y 'fatiga' (20 eventos en 14 pacientes).

En total, 192 de los AE registrados se evaluaron por los investigadores como relacionados con la medicación del estudio. Estos AE relacionados con el tratamiento se observaron en 28 de los 34 pacientes. El ochenta y tres (83) por ciento de estos AE relacionados fueron trastornos gastrointestinales (68 %, 130 AE) registrados en 25 pacientes y trastornos generales (15 %, 29 AE) registrados en 16 pacientes.

Sobre la base de MedDRA PT, la mayoría de los eventos adversos relacionados fueron leves a moderados con náuseas (50 %), vómitos (47 %), fatiga (27 %), dolor abdominal (15 %), edema periférico (15 %), disminución del apetito (12 %) y diarrea (12 %) en más del 10 % de los pacientes.

Dos pacientes sufrieron una hipersensibilidad relacionada (reacción alérgica) durante la infusión del fármaco del estudio, una de las cuales se clasificó como moderada y la otra como grave. Ambos pacientes se recuperaron después de detener la infusión.

No se han informado valores de laboratorio anormales relacionados con el fármaco del estudio de CTC grado 4 (con amenaza para la vida) o 5 (muerte).

Existieron 12 (35,3 %) pacientes con eventos emergentes graves relacionados con el tratamiento. Se informaron AE relacionados con el fármaco de intensidad severa para 2 pacientes en el grupo de dosis de 300 mg/m^2, vómitos y en un paciente concomitantes con náuseas. En el grupo de dosis de 600 mg/m^2 10 pacientes experimentaron eventos adversos graves relacionados con el fármaco, 6 pacientes con vómitos de los cuales 3 pacientes experimentaron además náuseas, un paciente con hipersensibilidad (reacción alérgica), un paciente con hipersecreción salival, un paciente con deshidratación y un paciente con hipoalbuminemia. Los dos últimos pacientes también informaron vómitos y náuseas.

En el momento del análisis, 13 pacientes se habían recuperado de todos los eventos adversos relacionados con el fármaco, 2 pacientes se recuperaban, 11 pacientes no se recuperaron de al menos un AE y para 2 el estado era desconocido. De los 11 pacientes en los que no se recuperó al menos un evento adverso relacionado con el fármaco, 9 tenían trastornos gastrointestinales (4 náuseas, 2 vómitos).

Hubo 13 pacientes con 31 SAE documentados, lo que incluye 7 muertes. Un paciente falleció durante la fase de tamizaje, es decir, antes del comienzo de la infusión del fármaco del estudio y, por lo tanto, se clasificó como evento del tamizaje. En cuatro pacientes, el tratamiento de SAE gastrointestinales emergentes como vómitos (n = 4), náuseas (n = 2), exiccosis (n = 1) y hemorragia gastrointestinal (n = 1) se consideraron como relacionados con el tratamiento. Uno de estos pacientes con vómitos se trató con 300 mg/m^2 los otros tres se trataron con 600 mg/m^2 de IMAB362. Tres de estos cuatro pacientes se recuperaron, excepto uno que murió debido a una insuficiencia renal no relacionada.

La incidencia de eventos adversos relacionados con el fármaco fue comparable entre los grupos de dosis de 300 y 600 mg/m^2 con 75 % y 83 % de los pacientes, respectivamente. La frecuencia y la gravedad de las náuseas, los vómitos y la fatiga también fueron comparables entre ambos grupos de dosis. No hubo una relación clara entre la dosis y la frecuencia/gravedad de los eventos adversos.

El perfil de eventos adversos con la mayoría de los AE informados para el tracto gastrointestinal coincide con la enfermedad subyacente y también con el perfil de expresión de la CLDN18.2. Se sugiere que las náuseas y los vómitos son un efecto en el objetivo ya que la CLDN18.2 también se expresa en las células epiteliales gástricas (en las uniones estrechas).

En términos generales, se observó que el IMAB362 administrado en dosis múltiples de 300 y 600 mg/m^2 fue seguro y bien tolerado con vómitos y náuseas como el evento adverso relacionado más común.

B. Evaluación de farmacocinética e inmunogenicidad

Los datos preliminares de la concentración del fármaco para la aplicación de dosis repetidas de IMAB362 están disponibles para los cuatro pacientes de la primera y los 34 pacientes de la segunda y tercera cohorte, quienes recibieron 300 mg/m^2 y 600 mg/m^2 de IMAB362, respectivamente.

Tabla 11: $C_{máx}$ (concentración máxima de fármaco en suero) después de la primera y quinta administración de IMAB362

Cohorte/dosis	**Paciente**	**cmáx después de la 1ra infusión [µg/ml]**		**cmáx después de la 5ta infusión [µg/ml]**	
Cohorte 1 [300 mg/m^2]	1001-01	349,6	±179,2**	293.9	± 26,9
	1001-07	341,6	± 22,1	n.a.	n.a.
	2002-02	253.3	± 7,1	326.5	± 3,6
	1001-10	208.9	± 3,2	259.1	± 8,2
Cohorte 2 [600 mg/m^2]	1005-03	343.6	± 10,8	n.a.	n.a.
	1005-04	256.9	± 5.7	n.a.	n.a.
	1005-11	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1001-08	325.1	± 12,6	485.4	± 6,7
	2002-05	272.2	± 3,6	642.6	± 17,9
	2002-07	325.3	± 10,0	516.7	± 1,9
	1011-05	296.1	± 13,7	385.8	± 15,1
	1013-02	310.9	± 4,7	428,0	± 17,9
	4001-11	323.4	± 8,9	n.a.	n.a.
	1005-10	389.8	± 0,7	457.6	± 8,0
	1001-24	390.8	± 6,7	433.8	± 6,6
	1001-27	309.3	± 10,7	n.a.	n.a.
	1003-10	300.7	± 2,1	n.a.	n.a.
	1004-07	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1004-10	448.3	± 5,7	n.a.	n.a.
	1004-11	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1005-18	269.2	± 6,7	n.a.	n.a.
	1005-26	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	1005-27	473.6	± 10,6	n.a.	n.a.

Cohorte 3 [600 mg/m2]	1005-29	280.2	± 16,7	n.a.	n.a.
	1005-34	385.5	± 18,8	n.a.	n.a.
	1006-03	317,0	± 14,8	278.1	± 8,9
	1006-05	276,0	± 18,2	n.a.	n.a.
	1007-09	397,0	± 12,5	n.a.	n.a.
	1011-09	411.1	± 12,1	535.9	± 17,0
	1011-16	322.5	± 8,5	314.5	± 15,6
	1011-17	462.3	± 10,6	n.a.	n.a.
	1011-20	347.9	± 14,4	570.3	± 10,1
	1012-01	433.7	± 9,7	n.a.	n.a.
	2003-08	575.1	± 30,7	n.a.	n.a.
	2003-10	421.8	± 3,4	520.5	± 6,5
	2003-13	344.7	± 21,6	n.a.	n.a.
	2003-15	380.9	± 3,1	n.a.	n.a.
	2003-16	466.8	± 6,8	n.a.	n.a.
** resultados de CV altos a partir de un valor atípico en la medición por triplicado					

Se tomaron muestras de sangre antes de cada infusión. Después de la primera infusión, se tomaron muestras adicionales al final de la infusión y 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 12, 24 horas, 3 y 6 días después del final de la infusión. Después de la última infusión, se tomaron muestras al final de la infusión y 1, 1,5, 2 horas y 14 días, así como también, 4 a 8 semanas después del final de la última infusión. No pudo detectarse analito en las muestras anteriores a la dosis de pacientes individuales asignados a las cohortes 1-3.

Después de la primera infusión de IMAB362, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 208,9 µg/ml y 349,6 µg/ml para la primera cohorte. Para la segunda y tercera cohortes, tomadas juntas, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 269,1 µg/ml y 575,1 µg/ml después de la primera aplicación.

En las muestras de suero tomadas en puntos temporales posteriores (V3 a V5), se observó una reducción dependiente del tiempo de la concentración de IMAB362 (Figura 8). En la visita 5 antes de la segunda infusión, se determinaron niveles séricos mínimos entre 11,3 µg/ml y 36,8 µg/ml (valor medio 22,5 ± 10,5 µg/ml) para la cohorte 1 y 17,0 µg/ml y 100,2 µg/ml (valor medio 54,5 ± 29,0 µg/ml) para las cohortes 2 y 3 tomadas juntas.

En la visita 8 (día 57) antes de la quinta infusión, se determinaron niveles séricos mínimos entre 32,4 µg/ml y 67,1 µg/ml (valor medio 46,1 ± 18,5 µg/ml) para la cohorte 1 y 28,3 µg/ml y 301,6 µg/ml (valor medio 147,2 ± 93,1 µg/ml) para las cohortes 2 y 3 (Tabla 12).

Después de la infusión en la visita 8, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 259,1 µg/ml y 326,5 µg/ml para la primera cohorte y 278,1 µg/ml y 642,6 µg/ml para las cohortes 2 y 3 (Tabla 11).

Para la cohorte 1, los valores medios de $C_{máx}$ se determinaron 90 minutos después de la primera infusión de IMAB362 (270,6 ± 63,9 µg/ml) y 90 min después de la quinta infusión (279,2 ± 27,7). Para las cohortes 2 y 3 juntas, los valores medios de $C_{máx}$ se determinaron al final de la primera infusión de IMAB362 (340,8 ± 80,2 µg/ml) y 60 min después de la quinta infusión (443,3 ± 97,7) (Tabla 12).

En resumen, los niveles séricos medidos de IMAB362 mostraron que en los pacientes tratados con 300 mg/m^2 la concentración sérica de IMAB362 cae por debajo del nivel deseado de 50-100 µg/ml entre 2 ciclos semanales. Por el contrario, a una dosis de 600 mg/m^2, en la gran mayoría de los pacientes, los niveles séricos de IMAB362 estaban por encima de 50 µg/ml, incluso 2 semanas después de la primera aplicación. Siete a 29 días (valor medio 15 días) después de la 5ta administración, el nivel de dosis fue superior a 50 µg/ml (valor medio 151,3 ± 90,1 µg/ml).

Tabla 12: Datos farmacocinéticos descriptivos de la administración repetida de 300 y 600 mg/m^2 de IMAB362

Concentración media ± sd (µg/ml) de IMAB362 en suero de 4 pacientes tratados con dosis repetidas de 300 mg/m^2 (cohorte 1) y hasta 30 pacientes (30 pacientes la primera infusión, 12 pacientes la quinta infusión) tratados con dosis repetidas de 600 mg/m^2 (cohorte 2 y cohorte 3 juntas).		
	Concentración (media ± sd) de IMAB362 [µg/ml]	
Dosis de IMAB362	300 mg/m^2	600 mg/m^2
$c_{máx}$ después de la 1ra infusión	270,6 ± 63,9	340,8 ± 80,2
Nivel anterior a la dosis antes de la 2da infusión	22,5 ± 10,5	54,3 ± 29,0
Nivel anterior a la dosis antes de la 3ra infusión	34,9 ± 15,8	89,9 ± 62,3
Nivel anterior a la dosis antes de la 4ta infusión	44,9 ± 14,5	128,7 ± 80,6
Nivel anterior a la dosis antes de la 5ta infusión	46,11 18,5	147,2 ± 93,1
$c_{máx}$ después de la 5ta infusión	279,2 ± 27,7	443,3 ± 97,7
después de la 5ta administración	34,5 ± 12,2	151,3 ± 90,1

Se observó una acumulación leve de IMAB362 de ciclo a ciclo. Los factores de acumulación variaron de 1,03 veces a 3,52 veces en base al primer valor anterior a la dosis antes de la segunda infusión (valor medio 2,04).

Tabla 13: Acumulación de IMAB362 después de infusiones repetidas

Para determinar los factores de acumulación, se calcularon las relaciones de concentración de IMAB362 antes de las visitas 6, 7, 8 y 9.x (tratamiento con respuesta) y antes de la segunda infusión (visita 5).								
Cohorte 3		anterior a la infusión						
Factor de acumulación	Producción realizada	V6/V5	V7/V5	V8/V5	V9.1/V5	V9.2/V5	V9.3/V5	V9.4/V5
Paciente 101105	F02	1,73	2,10	2,16				
Paciente 101302	F02	1,78	2,36	2,08	1,70	1,82	2,03	2,28
Paciente 400111	F02	2,04	2,44					
Paciente 100510	# 15	1,83	2,41	2,24				
Paciente 100124	# 15	2,33	2,69	2,42	1,98	3,17	2,54	1,49
Paciente 100410	# 15	3,05						
Paciente 100529	F02	1,49	1,66					
Paciente 100603	F02	1,21	1,39	1,66	1,92	3,52		
Paciente 100605	F02	1,12	1,83					
Paciente 101109	# 15	2,12	2,70	2,29				
Paciente 101120	# 15	1,71	2,12	2,39				
Paciente 200310	# 15	1,03	1,35	1,30				

En conclusión, se encontró que la farmacocinética de IMAB362 depende de la dosis.

Después de la primera infusión de IMAB362, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 208,9 µg/ml y 349,6 µg/ml para la primera cohorte. Para la segunda y tercera cohortes, tomadas juntas, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 269,1 µg/ml y 575,1 µg/ml después de la primera aplicación.

En muestras de suero tomadas en puntos temporales posteriores (V3 a V5), se observó una reducción dependiente del tiempo de la concentración de IMAB362. En la visita 5 antes de la segunda infusión, se determinaron niveles séricos mínimos entre 11,3 µg/ml y 36,8 µg/ml (valor medio 22,5 ± 10,5 µg/ml) para la cohorte 1 y 17,0 µg/ml y 100,2 µg/ml (valor medio 54,5 ± 29,0 µg/ml) para las cohortes 2 y 3 tomadas juntas.

En la visita 8 (día 57) antes de la quinta infusión, se determinaron niveles séricos mínimos entre 32,4 µg/ml y 67,1 µg/ml (valor medio 46,1 ± 18,5 µg/ml) para la cohorte 1 y 28,3 µg/ml y 301,6 µg/ml (valor medio 147,2 ± 93,1 µg/ml) para las cohortes 2 y 3.

Después de la 5ta infusión en la visita 8, los valores de $C_{máx}$ variaron entre 259,1 µg/ml y 326,5 µg/ml para la primera cohorte y 278,1 µg/ml y 642,6 µg/ml para las cohortes 2 y 3.

Para la cohorte 1, los valores medios de $C_{máx}$ se determinaron 90 minutos después de la primera infusión de IMAB362 (270,6 ± 63,9 µg/ml) y 90 min después de la quinta infusión (279,2 ± 27,7). Para las cohortes 2 y 3 juntas, los valores medios de $C_{máx}$ se determinaron al final de la primera infusión de IMAB362 (340,8 ± 80,2 µg/ml) y 60 min después de la quinta infusión (443,3 ± 97,7).

En resumen, los niveles séricos medidos de IMAB362 mostraron que en los pacientes tratados con 300 mg/m^2 la concentración sérica de IMAB362 cae por debajo del nivel deseado de 50-100 µg/ml entre 2 ciclos semanales. Por el contrario, a una dosis de 600 mg/m^2, en la gran mayoría de los pacientes, los niveles séricos de IMAB362 estaban por encima de 50 µg/ml, incluso 2 semanas después de la primera aplicación. Siete a 29 días (valor medio 15 días) después de la 5ta administración, el nivel de dosis fue superior a 50 µg/ml (valor medio 151,3 ± 90,1 µg/ml).

C. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Conjunto de análisis completo (FAS):

Se incluyeron todos los sujetos que recibieron medicación del estudio al menos una vez y para quienes estuvieron disponibles los datos de eficacia del tratamiento.

En el momento del análisis, 50 pacientes se han incluido en una dosis de 600 mg/m^2. Nueve de ellos se han incluido recientemente y no hay datos adicionales disponibles en este momento debido a su reciente inclusión. Para diez pacientes no se ha tomado una segunda obtención de imágenes del tumor y, por lo tanto, estos pacientes no se incluyeron en el conjunto FAS. El conjunto FAS comprende 31 pacientes.

La mediana de edad fue de 57 años con un intervalo de 35 a 77. Los pacientes del conjunto FAS tenían una mediana del índice de Karnofsky del 90 % (intervalo de 70 a 100 %). La gran mayoría (81 %) de los pacientes se ha tratado previamente con al menos un régimen de quimioterapia. Seis (6) pacientes no tenían un régimen de quimioterapia anterior.

Tabla 14: Detalles sobre regímenes de quimioterapia anteriores en el conjunto FAS (n=31).

	5-FU/Capecitabina	Compuesto de platino	Taxanos	Epirrubicina	Irinotecano	AcM/otros agentes
Núm. de pacientes	25 (81 %)	23 (74 %)	14 (45 %)	8 (26 %)	8 (26 %)	6 (19 %)

La mediana del número de regímenes de quimioterapia anteriores fue de 2,0 (intervalo de 0 a 5). Los regímenes de quimioterapia para el cáncer gastroesofágico consisten principalmente en diversas combinaciones de derivado de 5-FU, compuesto de platino, taxanos, epirrubicina, irinotecano, trastuzumab para pacientes positivos para HER2/neu y otros agentes de investigación. En el conjunto FAS, el 81 % de los pacientes tuvieron al menos una vez 5-FU o capecitabina y el 74 % se trataron con un compuesto de platino al menos una vez antes de la inclusión. Seis (6, 19 %) pacientes se han tratado previamente con trastuzumab u otros agentes de investigación. Seis (6, 19 %) pacientes recibieron, además, radioterapia antes del comienzo del estudio.

Debido al estadio tardío de la enfermedad, los pacientes tenían una mediana de 2,0 sitios metastásicos (intervalo de 1,0 a 4,0). Los más prominentes fueron los ganglios linfáticos (19 pacientes, 61 %); hígado (13 pacientes, 42 %); ascitis (8 pacientes, 26 %) y peritoneo (7 pacientes, 23 %).

La tasa general de control de la enfermedad fue del 39 % (Tabla 15). Cuatro pacientes tenían una respuesta parcial confirmada y 8 pacientes tenían una estabilización de la enfermedad. La primera reevaluación para estos pacientes se realizó de 8 a 11 semanas después de la primera infusión, excepto para dos pacientes, para quienes la primera reevaluación del tumor se realizó 6 semanas después, respectivamente.

Tabla 15: Evaluación de la mejor respuesta de acuerdo con RECIST, conjunto FAS

Mejor Respuesta	**n**	**%**
PR	4	13
SD	8	26
PD	19	62
Total	31	100

En 6 de los 12 pacientes con control clínico de la enfermedad, al menos un marcador tumoral (CEA; CA19-9; CA125; CA15-3) que se elevó al inicio del estudio disminuyó en un 35 a 76 % a lo largo del estudio. En tres pacientes, todos los marcadores tumorales estaban por debajo del valor de corte y para un paciente no había resultados disponibles de marcadores tumorales.

Curiosamente, también 4 pacientes con enfermedad progresiva como mejor respuesta tuvieron una disminución del marcador tumoral entre 29 y 54 % durante el estudio.

Se alcanzaron respuestas parciales después de 2,3 meses de tratamiento (dos pacientes), 6,5 meses (un paciente) y 4,8 meses (un paciente), respectivamente. La PR se confirmó para un paciente, duró otros 4,4 meses, lo que condujo a una PFS de 9,2 meses para este paciente. Para los otros tres pacientes, las confirmaciones se realizaron después de 6 (un paciente) y 12 semanas (dos pacientes), respectivamente. Pueden encontrarse más detalles en la Tabla 16.

Tabla 16: Evaluación detallada del conjunto FAS en un análisis por paciente

n.a. - datos aún no disponibles; n.d. - no detectable. * - censurado ya que el evento no tuvo lugar hasta noviembre de 2012 o se desconoce la fecha exacta en este momento. Se ha usado en cada caso la última fecha de seguimiento. # - el marcador tumoral está por debajo del valor de corte. No se han contado en el texto debido a eso.

Núm. de paciente	Núm. de Inf.	Núm. de Tx anteriores	Núm. de sitios de metástasis	IHC		Estado al ingreso	Mejor respuesta		PFS [semanas]	OS [meses]
				Máx.	Media núm. de células		RECIST (cambio)	Marcador tumoral		
2002-05	17	0	2	3	87	n.a.	SD (n.d.)	CA125 - 59 %#	40	
1001-08	11	4	2	3	83	PD	SD (± 0 %)	CA19-9- 35 %	23	
1007-02	16	1	2	2	70	SD	PR (-51 %)	CA15_3 - 65 %#	40	
4001-12	2	2	2	2	63	n.a.	SD (+18 %)	n.a.	6	6,41
1013-02	9	5	4	3	68	n.a.	SD (+5 %)	aumenta	18	
1011-09	5	0	3	3	67	PD	SD (-25 %)	CA125 - 25 %	10*	
1001-24	8	2	4	2	50	PD	SD (0 %)	aumenta	16*	5,61
1006-03	17	3	3	3	70	SD	PR (-34 %)	CA125 - 37 %	34*	
1007-09	11	1	2	3	73	SD	SD (n.a.)	CA15_3- 42 %#	23*	
2003-15	11	0	3	3	80	PD	PR (-35 %)	CA125 - 35 %	22*	
								CA19-9 - 76 %		
2003-16	11	1	4	2	90	PD	PR (-39 %)	CA125 - 75%	22*	
1005-34	5	4	3	2	50	SD	SD (+17 %)	CEA -35 %	11*	
2002-07	5	0	1	2	50	PD	PD (n.d.)	n.d.	11	
4001-09	5	0	1	2	40	PD	PD (+40 %)	aumenta	10	
1005-13	5	5	2	3	65	n.a.	PD (+63 %)	aumenta	10	

4001-01	5	2	3	2	60	PD	PD (+60 %)	n.d.	9	
1004-10	3	1	4	2	83	SD	PD (+4 %)	aumenta	6	
								CA15_3-40 %		
1005-10	5	4	2	3	53	PD	PD (-2 %)	CA125 -54 %	10	
1004-11	5	1	3	2	40	n.a.	PD (+32 %)	CA19_9-32 %	10	4,3
								CA15_3		
4001-11	4	4	3	3	80	n.a.	PD (+6 %)	-49%;	7	
1011-05	5	1	2	2	58	n.a.	PD (+72 %)	aumenta	10	
1009-01	4	1	1	3	63	SD	PD (+71 %)	aumenta CEA -29 %	8	
1011-16	5	2	1	3	75	PD	PD (-26 %)	CA15_3-28 %	9	3,8
1012-01	3	2	1	2	50	n.a.	PD (+12 %)	aumenta	7	
1005-18	3	3	3	3	60	PD	PD (+3 %)	aumenta	5	
2003-10	5	0	4	2	60	n.a.	PD (+8 %)	aumenta	10	
1011-20	5	2	1	3	48	n.a.	PD (+82 %)	aumenta	9	
1003-10	2	2	2	3	50	n.a.	PD (n.a.)	n.a.	4*	
1001-27	3	4	4	3	73	n.a.	PD (n.a.)	n.a.	5*	1,6
1006-05	5	3	3	3	60	n.a.	PD (+73 %)	aumenta	10*	4,3
1005-29	3	3	2	3	75	SD	PD (+3 %)	aumenta	7	

La mediana de supervivencia libre de progresión para pacientes en el conjunto FAS fue de 10 semanas (mínimo de 4 semanas; máximo de 40 semanas). Debido a la disponibilidad restringida de eventos, la mediana de supervivencia libre de progresión para pacientes con beneficio clínico (PR + SD) que se muestra en la Figura 9 tiene un valor limitado. Los pacientes sin beneficio clínico (PD) tuvieron una mediana de supervivencia libre de progresión de 9 semanas (mínimo de 4 semanas; máximo de 11 semanas) (Figura 9).

No existió diferencias entre los pacientes con beneficio clínico (PR o SD como mejor respuesta) o enfermedad progresiva (PD como mejor respuesta) con respecto a la edad (media de 56 frente a 59 años), sin régimen anterior de quimioterapia (media de 1,9 frente a 2,1), Índice de Karnofsky (media de 89 frente a 88 %). Solo el número de sitios metastásicos fue menor en el grupo con respuesta con una media de 1,9 en comparación con 2,3 en el grupo de sin respuesta. Estas diferencias no fueron significativas estadísticamente.

La intensidad (media y máxima) de la tinción con IHC fue similar entre pacientes con beneficio clínico y enfermedad progresiva. El número de células teñidas fue diferente entre ambos grupos. El número máximo de células teñidas y el número medio de células teñidas fueron mayores en los pacientes con beneficio clínico con una media del 77 % frente al 67 % y 71 % frente al 60 %, respectivamente. Además, se observaron diferencias con respecto a la localización de las metástasis. En los pacientes con beneficio clínico, la frecuencia de derrame pleural (25 % frente a 5 %), carcinomatosis peritoneal (42 % frente a 11 %) y ascitis (42 % frente a 16 %) fue mayor en comparación con los pacientes con enfermedad progresiva como mejor respuesta. La presencia de metástasis hepáticas fue mucho menor (17 % frente a 58 %) en pacientes con beneficio clínico.

Conjunto por protocolo (PP):

La población PP incluyó a todos los pacientes que completaron la sección de tratamiento (hasta la visita 9) sin ninguna desviación importante del protocolo.

De los 31 pacientes en el grupo FAS, dos tuvieron una violación importante del protocolo (sin lesión objetivo) y nueve pacientes no completaron el protocolo del estudio hasta la visita 9, y por lo tanto, tenían menos de las 5 infusiones requeridas de IMAB362. El conjunto PP comprende 20 pacientes.

La mediana de la edad fue de 60 años con un intervalo de 35 a 77. Los pacientes del conjunto PP tenían una mediana del Índice de Karnofsky del 90 % (intervalo de 70 a 100 %). La gran mayoría (80 %) de los pacientes se ha tratado previamente con al menos un régimen de quimioterapia. Cuatro (4) pacientes no tenían un régimen de quimioterapia anterior.

Tabla 17: Detalles sobre regímenes de quimioterapia anteriores en el conjunto PP (n = 20).

	5-FU/Capecitabina	Compuesto de platino	Taxanos	Epirrubicina	Irinotecano	AcM/otros agentes
Núm. de pacientes	16 (80 %)	15 (75 %)	11 (55 %)	4 (20 %)	5 (25 %)	5 (25 %)

La mediana del número de regímenes de quimioterapia anteriores fue de 2,0 (intervalo de 0 a 5). Los regímenes de quimioterapia para el cáncer gastroesofágico consisten principalmente en diversas combinaciones de derivado de 5-FU, compuesto de platino, taxanos, epirrubicina, irinotecano, trastuzumab para pacientes positivos para HER2/neu y otros agentes de investigación. En el conjunto PP, el 80 % de los pacientes tuvieron al menos una vez 5-FU o capecitabina y el 75 % se trataron con un compuesto de platino al menos una vez antes de la inclusión. Cinco (5, 25 %) pacientes se han tratado previamente con trastuzumab u otros agentes en investigación. Pueden encontrarse más detalles en la Tabla 17. Cinco (5, 25 %) pacientes también recibieron radioterapia antes del comienzo del estudio.

Debido a la etapa tardía de la enfermedad, los pacientes tuvieron una mediana de 3,0 sitios metastásicos (intervalo de 1,0 a 4,0). Los más prominentes fueron los ganglios linfáticos (13 pacientes, 65 %); hígado (9 pacientes, 45 %); ascitis (6 pacientes, 30 %) y pulmón (5 pacientes, 25 %).

La tasa general de control de la enfermedad fue del 50 %. Cuatro pacientes habían confirmado respuesta parcial y 6 estabilización de la enfermedad. La primera reevaluación para estos pacientes se realizó de 8 a 11 semanas después de la primera infusión, excepto para un paciente, para quien la primera reevaluación del tumor se realizó después de 6 semanas, respectivamente (Tabla 18).

Tabla 18: Evaluación de la mejor respuesta de acuerdo con RECIST, conjunto PP.

Mejor Respuesta	N	%
PR	4	20
SD	6	30
PD	10	50
Total	20	100

En 6 de los 10 pacientes con control clínico de la enfermedad, al menos un marcador tumoral (CEA; CA19-9; CA125; CA15-3) que se elevó al inicio del estudio disminuyó en un 35 a 76 % a lo largo del estudio. En dos pacientes, todos los marcadores tumorales estaban por debajo del valor de corte y para un paciente no había resultados disponibles de marcadores tumorales.

Curiosamente, también 3 pacientes con enfermedad progresiva como mejor respuesta tuvieron una disminución del marcador tumoral entre 29 y 54 % durante el estudio.

Se alcanzaron respuestas parciales después de 2,3 meses de tratamiento (dos pacientes), 6,5 meses (un paciente) y 4,8 meses (un paciente), respectivamente. La PR se confirmó para un paciente, duró otros 4,4 meses, lo que condujo a una PFS de 9,2 meses para este paciente. Para los otros tres pacientes, las confirmaciones se realizaron después de 6 (un paciente) y 12 semanas (dos pacientes), respectivamente. Pueden encontrarse más detalles en la Tabla 19.

Tabla 19: Evaluación detallada del conjunto PP en un análisis por paciente

n.a. - datos aún no disponibles; n.d. - no detectable. * - censurado ya que el evento no tuvo lugar hasta noviembre de 2012 o se desconoce la fecha exacta en este momento. Se ha usado en cada caso la última fecha de seguimiento. # - el marcador tumoral está por debajo del valor de corte. No se han contado en el texto debido a eso.

Núm. de Paciente	Núm. de Inf.	Núm. de Tx anteriores	Núm. de sitios de metástasis	IHC		Estado al ingreso	Mejor respuesta		PFS [semanas]	OS [meses]
				Máx.	Media núm. de células		RECIST (cambio)	Marcador tumoral		
1001-08	11	4	2	3	83	PD	SD (± 0 %)	CA19-9 - 35 %	23	
1007-02	16	1	2	2	70	SD	PR (-51 %)	CA15_3 - 65 %#	40	
1013-02	9	5	4	3	68	n.a.	SD (+5 %)	aumenta	18	
1011-09	5	0	3	3	67	PD	SD (-25 %)	CA125 - 25 %	10*	
1001-24	8	2	4	2	50	PD	SD (± 0 %)	aumenta	16*	5.6[1]
1006-03	17	3	3	3	70	SD	PR (-34 %)	CA125 - 37 %	34*	
								CA15_3 - 42 %#		
1007-09	11	1	2	3	73	SD	SD (n.a.)	CA125 - 27 %#	23*	
2003-15	11	0	3	3	80	PD	PR (-35 %)	CA125 - 35 %	22*	
2003-16	11	1	4	2	90	PD	PR (-39 %)	CA19-9 - 76 % CA125 - 75 %	22*	
								CEA -35 %		
1005-34	5	4	3	2	50	SD	SD(+17 %)	CA 125 - 11 %	11*	
4001-09	5	0	1	2	40	PD	PD (+40 %)	aumenta	10	
1005-13	5	5	2	3	65	n.a.	PD(+63 %)	aumenta	10	
4001-01	5	2	3	2	60	PD	PD(+60 %)	n.d.	9	
								CA15_3 - 40 %		
1005-10	5	4	2	3	53	PD	PD (-2 %)	CA125 - 54 %	10	
1004-11	5	1	3	2	40	n.a.	PD(+32 %)	CA19_9 - 32 %	10	4.3
1011-05	5	1	2	2	58	n.a.	PD(+72 %)	aumenta	10	
								CEA -29 %		

1011-16	5	2	1	3	75	PD	PD(-26 %)	CA15_3 - 28 %	9	3.8
2003-10	5	0	4	2	60	n.a.	PD (+8 %)	aumenta	10	
1011-20	5	2	1	3	48	n.a.	PD(+82 %)	aumenta	9	
1006-05	5	3	3	3	60	n.a.	PD(+73 %)	aumenta	10*	4.3

[1]Las mediciones se realizaron antes de las 4 semanas y, posteriormente, cada 3-12 semanas durante todo el estudio.

La mediana de supervivencia libre de progresión para pacientes en el conjunto PP fue de 18 semanas (mínimo de 9 semanas; máximo de 40 semanas). Debido a la disponibilidad restringida de eventos, la mediana de supervivencia libre de progresión para pacientes con beneficio clínico (PR + SD) que se muestra en la Figura 10 tiene un valor limitado. Los pacientes sin beneficio clínico (PD) tuvieron una mediana de supervivencia libre de progresión de 10 semanas (mínimo de 9 semanas; máximo de 10 semanas) (Figura 10).

No existió diferencias entre los pacientes con beneficio clínico (PR o SD como mejor respuesta) o enfermedad progresiva (PD como mejor respuesta) con respecto a la edad (media de 57 frente a 62 años), sin régimen de quimioterapia anterior (media de 2,1 frente a 2,0), Índice de Karnofsky (media de 88 frente a 88 %). Solo el número de sitios metastásicos fue mayor en pacientes con beneficio clínico con una media de 3,0 en comparación con 2,2 en pacientes sin beneficio. Estas diferencias no fueron significativas estadísticamente. La intensidad (media y máxima) de la tinción con IHC fue similar entre pacientes con beneficio clínico y enfermedad progresiva. El número de células teñidas fue diferente entre ambos grupos. El número máximo de células teñidas y el número medio de células teñidas fueron mayores en los pacientes con beneficio clínico con un máximo del 76 % frente al 66 % y una media del 70 % frente al 66 %, respectivamente.

Además, se observaron diferencias con respecto a la localización de las metástasis. En los pacientes con beneficio clínico, la frecuencia de derrame pleural (30 % frente a 10 %), carcinomatosis peritoneal (40 % frente a 0 %) y ascitis (40 % frente a 20 %) fue mayor en comparación con los pacientes con enfermedad progresiva como mejor respuesta. La presencia de metástasis hepáticas fue mucho menor (20 % frente a 70 %) en pacientes con beneficio clínico.

En conclusión, el estado del tumor (de acuerdo con RECIST) a las 2 semanas después de la 5ta infusión de IMAB362 (V9) se comparó con el inicial. Para 31 pacientes (FAS), estaba disponible, al menos, una estadificación después del inicio. Los pacientes se inscribieron en una etapa terminal de la enfermedad con una mediana de 2,0 quimioterapias anteriores y 2,0 sitios metastásicos.

Se evaluó una respuesta parcial confirmada en cuatro pacientes, lo que condujo a una tasa de respuesta global del 13 %. Tres de ellos están actualmente en curso y no pudo calcularse la duración. Además, ocho pacientes tuvieron una estabilización de la enfermedad que condujo a una tasa de control de la enfermedad del 39 %. En el momento del análisis, la supervivencia libre de progresión de estos 12 pacientes con beneficio clínico varió entre 6 y 40 semanas. La mediana no pudo calcularse ya que el evento no se registró para 7 de estos pacientes hasta el momento. En 9 de los pacientes con beneficio clínico, al menos un marcador tumoral se elevó al inicio y disminuyó concomitantemente en -35 a -76 % en 6 de ellos. Curiosamente, también 4 pacientes con enfermedad progresiva como mejor respuesta tuvieron una disminución entre -29 y -54 % de al menos uno de los marcadores tumorales elevados durante el transcurso del estudio. La mediana de supervivencia libre de progresión general fue de 10 semanas con un intervalo de 4 a ~ 40 semanas.

En pacientes con beneficio clínico (4 PR + 8 SD = 39 %), la incidencia de carcinomatosis peritoneal, derrame pleural y ascitis fue mayor, y la incidencia de metástasis hepáticas fue menor que en pacientes sin beneficio. Por otro lado, un paciente con una respuesta parcial confirmada tuvo metástasis hepáticas frecuentes.

Con el conjunto de datos actual, parece que los pacientes con un beneficio clínico tuvieron un número mayor de células con tinción con IHC positiva.

Además, se recolectaron datos auxiliares en pacientes seleccionados, que muestran que los componentes del suero de los pacientes y las PBMC de los pacientes son completamente funcionales y potentes para mediar los principales modos de acción de IMAB362, CDC y ADCC, respectivamente.

En conclusión, se ha observado actividad antitumoral (respuesta parcial, enfermedad estable, disminución del marcador tumoral) y justifica una investigación adicional de IMAB362.

D. Conclusiones generales

Este ensayo se diseñó como un estudio clínico sin enmascaramiento, fase IIa, multicéntrico, no aleatorizado, de escalado de dosis múltiples entre pacientes, con 3 cohortes. Se requirió que los pacientes elegibles para este ensayo clínico fueran refractarios al tratamiento estándar o estuvieran sin terapia aceptada.
Para este informe provisional, 34 pacientes fueron evaluables para el análisis de seguridad (conjunto APT), de estos 4 se incluyeron en la cohorte 1 (300 mg/m^2), 6 en la cohorte 2 (600 mg/m^2) y 20 en la cohorte 3 (600 mg/m^2). El IMAB362 administrado en un esquema de dosis múltiples fue seguro y bien tolerado en pacientes fuertemente tratados previamente con cáncer gastroesofágico, con náuseas y vómitos como el evento adverso relacionado más común. La mayoría de los eventos adversos fueron leves a moderados. Solo hubo dos pacientes con reacciones alérgicas, una de grado moderado, una grave. No hubo eventos adversos de grado 4 y grado 5 (lo que incluye los parámetros de laboratorio) en este estudio fase IIa y el estudio fase I anterior. Es notable que el IMAB352 hasta ahora no haya provocado AE relacionados de grado 4, ya que la mayoría de los anticuerpos monoclonales registrados se asocian con efectos secundarios de grado 4 y 5 con amenaza para la vida. La indicación de bevacizumab para el cáncer de mama metastásico se revocó por la FDA en noviembre de 2011, después de la aprobación preliminar inicial en 2008. El bevacizumab no prolongó la vida y provocó hipertensión arterial y hemorragia severas, con perforación intestinal y perforación del tabique nasal. El cetuximab provoca erupciones cutáneas similares al acné y reacciones a la infusión de grado 3-4, anafilaxia y paro cardíaco, que requieren profilaxis con el antihistamínico difenhidramina antes del tratamiento.

El trastuzumab todavía se usa ampliamente, si bien provoca disfunción cardíaca sintomática en 2 a 7 % de los pacientes, lo que se conoce desde hace más de 10 años.

La medida principal para la evaluación de la posible actividad antitumoral fue el estado del tumor de acuerdo con RECIST. Hubo 31 pacientes que tuvieron al menos esta evaluación después del inicio y, por lo tanto, se incluyeron en el FAS. Cuatro PR y 8 SD en 31 (RR 13 %, DCR del 39 %) pacientes fuertemente tratados previamente se comparan muy bien con los resultados de respuesta en otros estudios fase II con monoterapia dirigida aprobada como tratamiento secundario o en estadio tardío.

El Cetuximab, un antagonista del EGFR, logró una RR del 3 % (con SD adicional del 7 %) en GEC en estadio tardío (la mayoría tenía 2 o más sitios metastásicos y terapias anteriores) medido después de 8 semanas en un ensayo fase II con treinta pacientes. En un segundo estudio con 55 pacientes en estadio tardío, el cetuximab condujo a un 5 % de RR y un 11 % adicional de SD medidas después de 8 semanas. Se lograron tasas de respuesta similares en pacientes con mCRC refractario positivo para EGFR donde se aprobó cetuximab posteriormente en esta indicación.

El Sunitinib y erlotinib se probaron en pacientes con GEC en estadio tardío en diferentes estudios fase II con un total de unos 150 pacientes. La DCR después de 6-8 semanas varió entre 16 y 39 % y la tasa de respuesta se informó entre 3 y 7 %, respectivamente.

La tasa de respuesta objetiva de fase II para el trastuzumab como terapia secundaria en cáncer de mama fue del 11 % con además 9 % de SD de ≥ 6 meses. Para el erlotinib en el cáncer de pulmón tratado previamente, se informó una tasa de respuesta del 9 %. El Sorafenib logró una RR entre 2 % y 18 % en dos ensayos fase II en cáncer renal y para el temsirolimus se informó una RR de 7 % en un ensayo de cáncer renal. Posteriormente, estos compuestos de terapia dirigida se desarrollaron aún más en combinación con quimioterapia y se registraron en estas indicaciones.

El IMAB362 es un anticuerpo seguro y eficaz. Como se esperaba de la especificidad de tejido exquisita de la molécula de superficie objetivo y la unión de alta precisión del anticuerpo, el fármaco en investigación se tolera bien en comparación con otras terapias dirigidas comercializadas. Además, en varios pacientes se ha observado evidencia de actividad clínica, comparable o mejor a los resultados de fase II de otras terapias dirigidas ya comercializadas.

Ejemplo 5: El IMAB362 indujo náuseas/vómitos

Se observó que el IMAB362 induce náuseas/vómitos hasta grado 3 de NCI-CTC. La sintomatología puede describirse de la manera siguiente: (i) no depende de la dosis, (ii) inicio agudo, principalmente dentro de los primeros minutos de la infusión, puede continuar después de finalizar la infusión, (iii) comienza con calambres epigástricos, hipersalivación, (iv) el vómito puede comenzar sin pródromos, (v) raro en pacientes con gastrectomía total, (vi) reacción a la primera infusión indicativa frente a aumento de los síntomas de un ciclo a otro ciclo.

El hecho de que estas reacciones adversas rara vez se produzcan en pacientes que se han sometido a gastrectomía total, sugiere que el mecanismo subyacente es un efecto sobre el objetivo. Con el IMAB362, el vómito es más frecuente que las náuseas y, a menudo, se informa que se produce sin náuseas prodrómicas. El inicio puede ser tanto agudo así como también retrasado. Presumimos que cantidades pequeñas de IMAB362 se unen al epítopo de unión estrecha de acceso restringido. Esto resulta en una alteración localizada de las uniones estrechas y el derrame de fugas de ácido gástrico en la submucosa. Las reacciones tisulares y los calambres resultantes inician una cascada de náuseas/vómitos.

Por lo tanto, las contramedidas recomendadas son la profilaxis antiemética eficiente y la protección de la mucosa gástrica.

Por ejemplo, los pacientes deberán recibir profilaxis antiemética antes de comenzar la medicación. Tanto para la profilaxis como para la intervención curativa, se recomienda una combinación de un bloqueador del receptor NK-1 (por ejemplo,

Aprepitant/Emend) y uno del receptor 5-HT3 (por ejemplo, Ondansetron/Zofran) y puede extenderse con compuestos adicionales. La medicación antiemética se administra, preferentemente, durante al menos los primeros tres días de cada ciclo. Puede considerarse la administración profiláctica de butilescopolamina/buscopan poco antes de cada infusión de IMAB362.

Cualquier medida para la protección de la mucosa puede reducir los síntomas gástricos. A este respecto, pueden usarse inhibidores de la bomba de protones y/o misoprostol y pueden, por ejemplo, administrarse en los días 1-2 o 3 de cada ciclo. No deben usarse fármacos antiinflamatorios no esteroidales (NSAID), pero se permite el paracetamol. Si el paracetamol no es eficiente para el manejo del dolor, pueden usarse NSAID si es necesario para el manejo del dolor para evitar el tratamiento con opioides. Los pacientes que reciben NSAID se tratan, preferentemente, con inhibidores de la bomba de protones y/o Misoprostol.

Por lo tanto, la profilaxis antiemética y la protección de la mucosa gástrica pueden comenzar poco antes de la infusión de IMAB362. Por ejemplo, puede administrarse la combinación siguiente, donde se prefiere la aplicación intravenosa:

- RA de NK-1: por ejemplo, Aprepitant/Emend (150 mg IV)
- RA de 5-HT3: por ejemplo, Palonosetron (0,25 mg IV), Ondansetron/Zofran (8 mg IV), Granisetron (3 mg IV)
- butilescopolamina/buscopan
- Inhibidor de la bomba de protones: Pantoprazol/Pantozol

Opcionalmente, también pueden administrarse Metoclopramida/MCP, Lorazepam y/o Atropina.

El IMAB362 es un anticuerpo que se basa predominantemente en modos de acción inmunológicos, lo que puede verse comprometido por compuestos inmunosupresores. Por esta razón, los esteroides deben evitarse en la profilaxis antiemética y solo usarse si otros compuestos han fallado.

Además, la exposición al IMAB362 debe recibir atención. Por ejemplo, se recomienda un monitoreo estrecho en los primeros 15-30 minutos. Si es necesario, debe enlentecerse la tasa de infusión (por ejemplo, hasta 4 h en lugar de 2 h) y deben incluirse los descansos de infusión.

La medicación antiemética, así como también la protección de la mucosa gástrica, podrían continuar, por ejemplo, hasta el día 3 de cada ciclo.

Archivo de referencia del agente o solicitante 342-77	Solicitud Internacional Núm.

INDICACIONES RELACIONADAS CON EL MICROORGANISMO U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

(Regla PCT 13*bis*)

A. Las indicaciones realizadas a continuación se relacionan con el microorganismo u otro material biológico depositado referido en la descripción en la página 44, línea 15.	
B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO	Los depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional [X]
Nombre de la institución que deposita DSMZ-Deutsche Sammlung on Mikoorganismen und Zellkulturen GmbH	
Dirección de la institución que deposita *(incluyendo código postal y país)* Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Fecha de depósito 19 de octubre de 2005	Número de Acceso DSM ACC2737
C. INDICACIONES ADICIONALES *(dejar en blanco si no aplica)*	Esta información continua en una hoja adicional [ ]
- Mieloma de ratón (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fusionado con esplenocitos de ratón (Mus musculus) - Hibridoma que secreta anticuerpos contra claudina-18A2 humana.	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN LAS INDICACIONES (*si las indicaciones no son para todos los Estados designados)*	
E. PROVISIÓN SEPARADA DE INDICACIONES *(dejar en blanco si no aplica)*	
Las indicaciones enumeradas a continuación se presentarán después en la Oficina Internacional *(especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso del Depósito")*	

Para uso exclusivo de la Oficina Receptora	Para uso exclusivo de la Oficina Internacional
[ ] Esta hoja se recibió con la solicitud internacional	[ ] Esta hoja se recibió por la oficina internacional el:
Funcionario autorizado	Funcionario autorizado

Formulario PCT/RO/134 (julio 1998; reimpreso enero 2004)

Hoja adicional para el material biológico

Identificación de depósitos adicionales:

1) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748) son:
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig
DE

2) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810) son:
DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Inhoffenstr. 7 B
38124 Braunschweig
DE

Fecha de los depósitos	Números de Acceso	Las indicaciones que se hacen más abajo se refieren al microorganismo depositado en la descripción en la(s) página(s) siguiente(s)
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2738	página 44, línea 16
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2739	página 44, línea 17
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2740	página 44, línea 18
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2741	página 44, línea 19
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2742	página 44, línea 20
19 de Octubre, 2005	DSM ACC2743	página 44, línea 21
17 de Noviembre, 2005	DSM ACC2745	página 44, línea 22
17 de Noviembre, 2005	DSM ACC2746	página 44, línea 23
17 de Noviembre, 2005	DSM ACC2747	página 44, línea 24
17 de noviembre, 2005	DSM ACC2748	página 44, línea 25
26 de Octubre, 2006	DSM ACC2808	página 44, línea 26
26 de Octubre, 2006	DSM ACC2809	página 44, línea 27
26 de Octubre, 2006	DSM ACC2810	página 44, línea 28

Indicaciones adicionales para todos los depósitos mencionados anteriormente:

- Mieloma de ratón (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fusionado con esplenocitos de ratón (Mus musculus)
- Hibridoma secretor de anticuerpos contra la claudina-18A2 humana

3) Depositante:

Todos los depósitos mencionados anteriormente se realizaron por:
Ganymed Pharmaceuticals AG
Freiligrathstraße 12
55131 Mainz
DE

Listado de secuencias

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

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

<130> 342-77 PCT

<150> PCT/EP2013/000817
<151> 2013-03-18

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
            20                  25                  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> 2
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe

165 170 175

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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

<400> 6

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

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

<210> 8
<211> 55
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

<210> 9
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 10
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 11
<211> 153
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
50 55 60

Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
65 70 75 80

Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
85 90 95

Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
100 105 110

Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
115 120 125

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
130 135 140

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 12
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13
<211> 326
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 13

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

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
            20                  25                  30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
        35                  40                  45

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65                  70                  75                  80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
                85                  90                  95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
            100                 105                 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
        115                 120                 125

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

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

```
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
            180                 185                 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
        195                 200                 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
    210                 215                 220

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

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
                245                 250                 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
            260                 265                 270

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 14
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 14

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 15
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 15

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

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

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

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

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

```
Glu Glu 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 Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 16
<211> 465
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
465

<210> 17
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 18
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465
```

<210> 19
<211> 469
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
                245                 250                 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
            260                 265                 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
        275                 280                 285

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
                325                 330                 335

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
465
```

<210> 20
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial
<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 21

```
Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 22
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 22

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

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

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

Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
    50                  55                  60

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

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 25
<211> 239
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27
<211> 240
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 29
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 29

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 30
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 30

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

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

<400> 31

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 32
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 33
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 34

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
20 25 30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
50 55 60

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 35
<211> 113
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 38
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 38

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 39
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

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

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

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

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 42
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 43
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 44

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

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 45

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

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 46

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

<210> 47
<211> 15
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 47

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

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 48

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

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 49

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

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Epítopo

<400> 50

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a la CLDN18.2 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad cancerosa de un paciente humano al evitar los eventos adversos de grado 4 y grado 5 del paciente, en donde el anticuerpo se administra a una dosis de al menos 300 mg/m^2 para proporcionar un nivel sérico de al menos 40 µg/ml, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 39, y en donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 y la cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24, en donde el anticuerpo se administra a una dosis de hasta 1000 mg/m^2.

2. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde el nivel sérico proporcionado está entre 40 µg/ml y 700 µg/ml.

3. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde el nivel sérico se proporciona durante al menos 7 días.

4. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos el 50 % de las células cancerosas del paciente son positivas para CLDN18.2 y/o al menos el 40 % de las células cancerosas del paciente son positivas para la expresión superficial de CLDN18.2.

5. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se administra en una dosis única o en dosis múltiples.

6. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo se administra en al menos 3 dosis.

7. El anticuerpo para su uso de conformidad con las reivindicaciones 5 o 6, en donde las dosis del anticuerpo se administran en intervalos de tiempo de al menos 7 días.

8. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tratamiento comprende, además, administrar uno o más seleccionados del grupo que consiste en antieméticos, antiespasmódicos, parasimpaticolíticos y agentes que protegen la mucosa gástrica.

9. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 8, en donde el tratamiento comprende administrar al paciente un antagonista del receptor de neuroquinina 1 (NK1) tal como Aprepitant (por ejemplo, Emend), un antagonista del receptor 5-HT3 tal como Ondansetron (por ejemplo, Zofran), Granisetrón (por ejemplo, Kytril, Sancuso) o Palonosetron (por ejemplo, Aloxi), o una combinación de dos o más de estos, un antiespasmódico tal como butilescopolamina (por ejemplo, Buscopan) y un inhibidor de la bomba de protones tal como Pantoprazol (por ejemplo, Pantozol).

10. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo se administra mediante infusión i.v.

11. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 10, en donde la infusión i.v. se realiza durante un período de tiempo de entre 1 y 4 horas.

12. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el anticuerpo media la muerte celular mediante una o más de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación.

13. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cáncer es cáncer gastroesofágico.

14. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el cáncer es cáncer gastroesofágico avanzado metastásico, refractario o recurrente.

15. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el paciente tuvo una terapia anterior con al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en análogos de pirimidina, compuestos de platino, epirrubicina, docetaxel y agentes detoxificantes para el tratamiento antineoplásico.

16. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el paciente tiene un estado funcional ECOG de entre 0 y 1 y/o un Índice de Karnofsky de entre 70 y 100 %.

17. El anticuerpo para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la CLDN18.2 tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

18. Un método para determinar la capacidad de respuesta de un paciente humano con cáncer al tratamiento de una enfermedad cancerosa con un anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, dicho método comprende la etapa de determinar en una muestra el nivel en sangre de uno o más marcadores en el paciente, en donde el marcador o los marcadores se seleccionan del grupo que consiste en CA 125, CA 15-3, CA 19-9, CEA, IL-2, IL-15, IFNγ y TNFα, y una disminución en el nivel de al menos uno de los marcadores después de la administración del anticuerpo indica que el paciente responde al tratamiento de una enfermedad cancerosa, o en donde el marcador es IL-6 y un aumento en el nivel del marcador después de la administración del anticuerpo indica que el paciente responde al tratamiento de la enfermedad cancerosa.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, en donde el nivel se determina en sangre, plasma o suero.

Figura 1

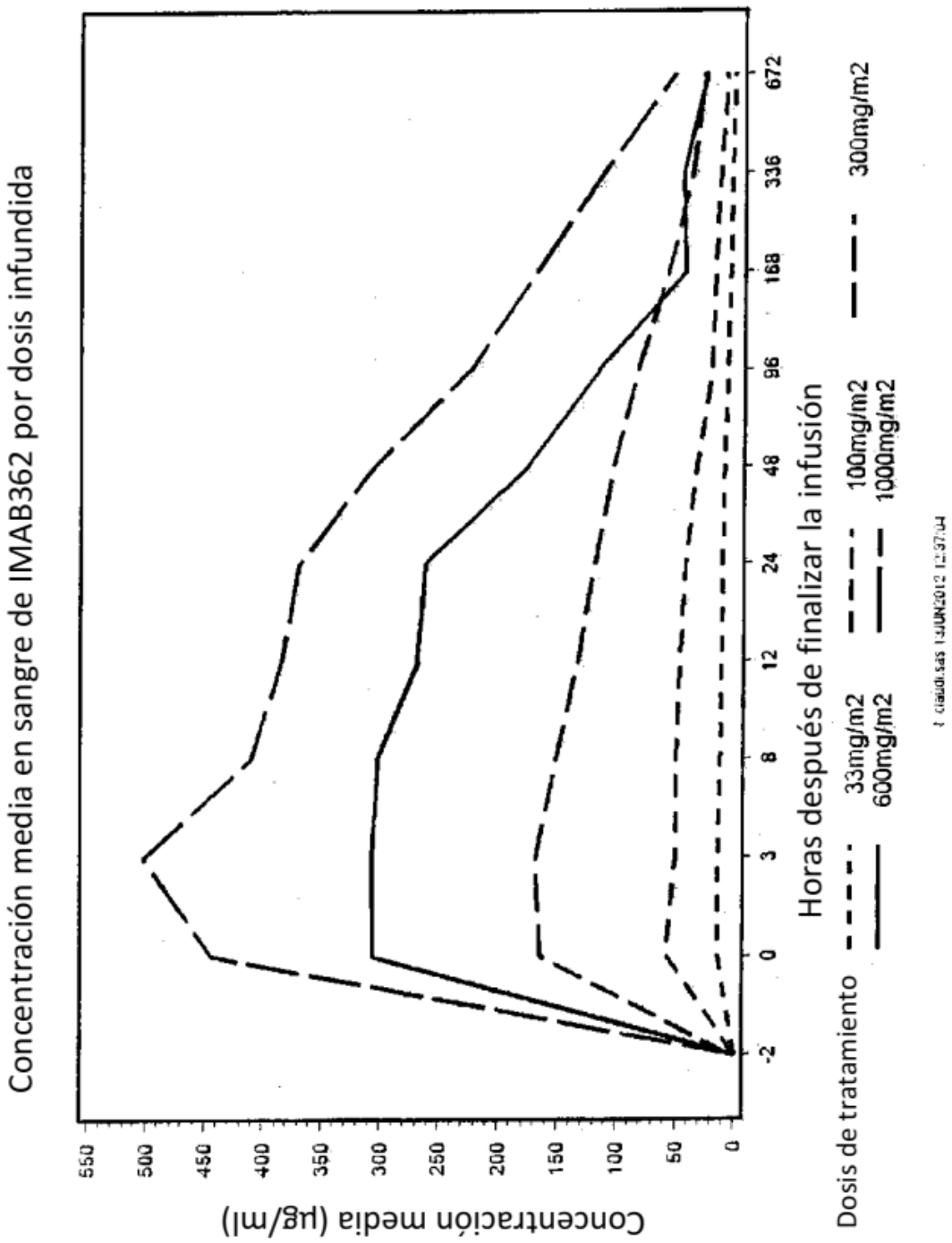

Concentración media en sangre de IMAB362 por dosis infundida
Concentración media (µg/ml)
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-2
0
3
8
12
24
48
96
168
336
672
Horas después de finalizar la infusión
Dosis de tratamiento
33mg/m2
100mg/m2
300mg/m2
600mg/m2
1000mg/m2

Figura 2

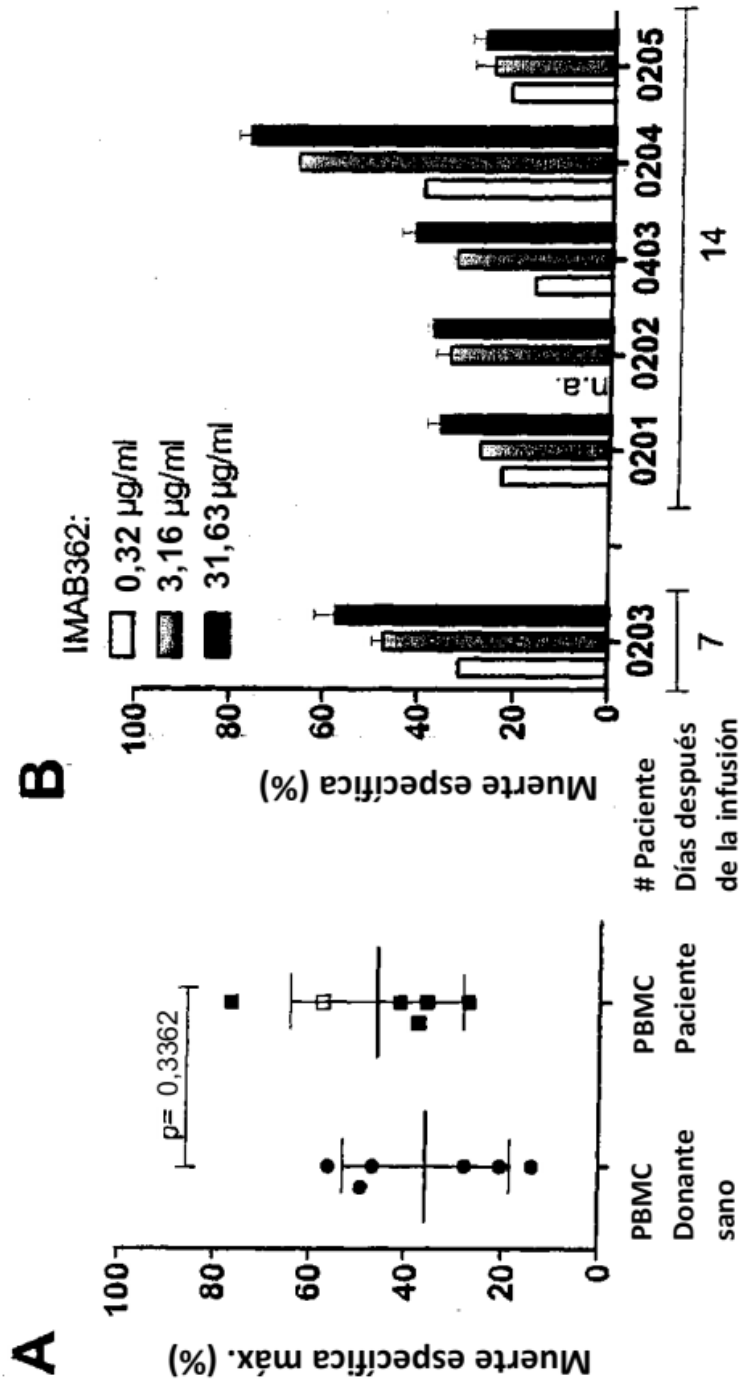

A
Muerte específica máx. (%)
100
80
60
40
20
0
p= 0,3362
PBMC
Donante sano
PBMC
Paciente
B
IMAB362:
0,32 µg/ml
3,16 µg/ml
31,63 µg/ml
Muerte específica (%)
n.a.
Paciente
Días después de la infusión
0203
7
0201
0202
0403
0204
0205
14

Figura 2

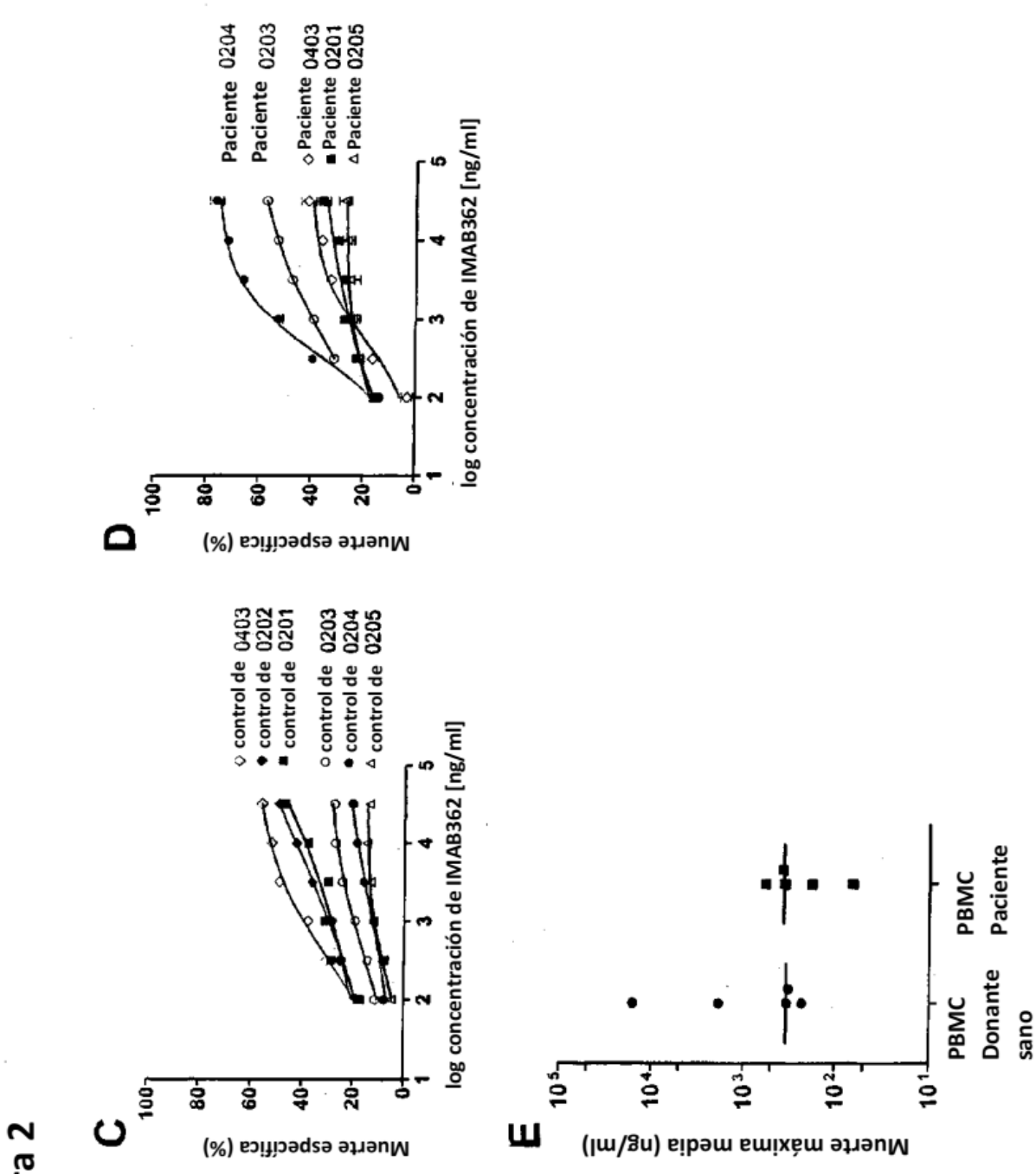

C
Muerte específica (%)
log concentración de IMAB362 [ng/ml]
control de 0403
control de 0202
control de 0201
control de 0203
control de 0204
control de 0205
D
Muerte específica (%)
log concentración de IMAB362 [ng/ml]
Paciente 0204
Paciente 0203
Paciente 0403
Paciente 0201
Paciente 0205
E
Muerte máxima media (ng/ml)
PBMC Donante sano
PBMC Paciente

Figura 3

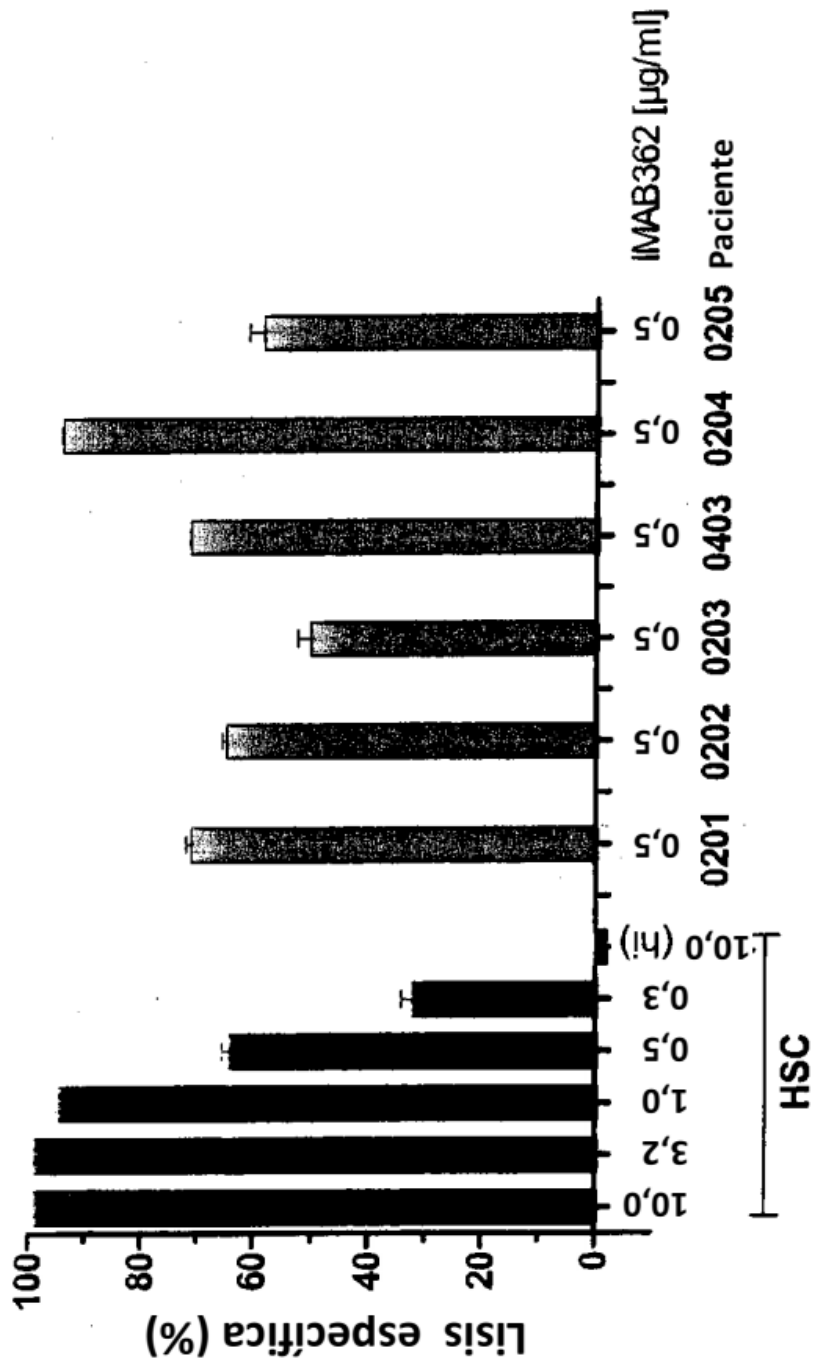

Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC
10,0
3,2
1,0
0,5
0,3
10,0 (hi)
0201 0202 0203 0403 0204 0205 Paciente
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
IMAB362 [µg/ml]

Figura 4

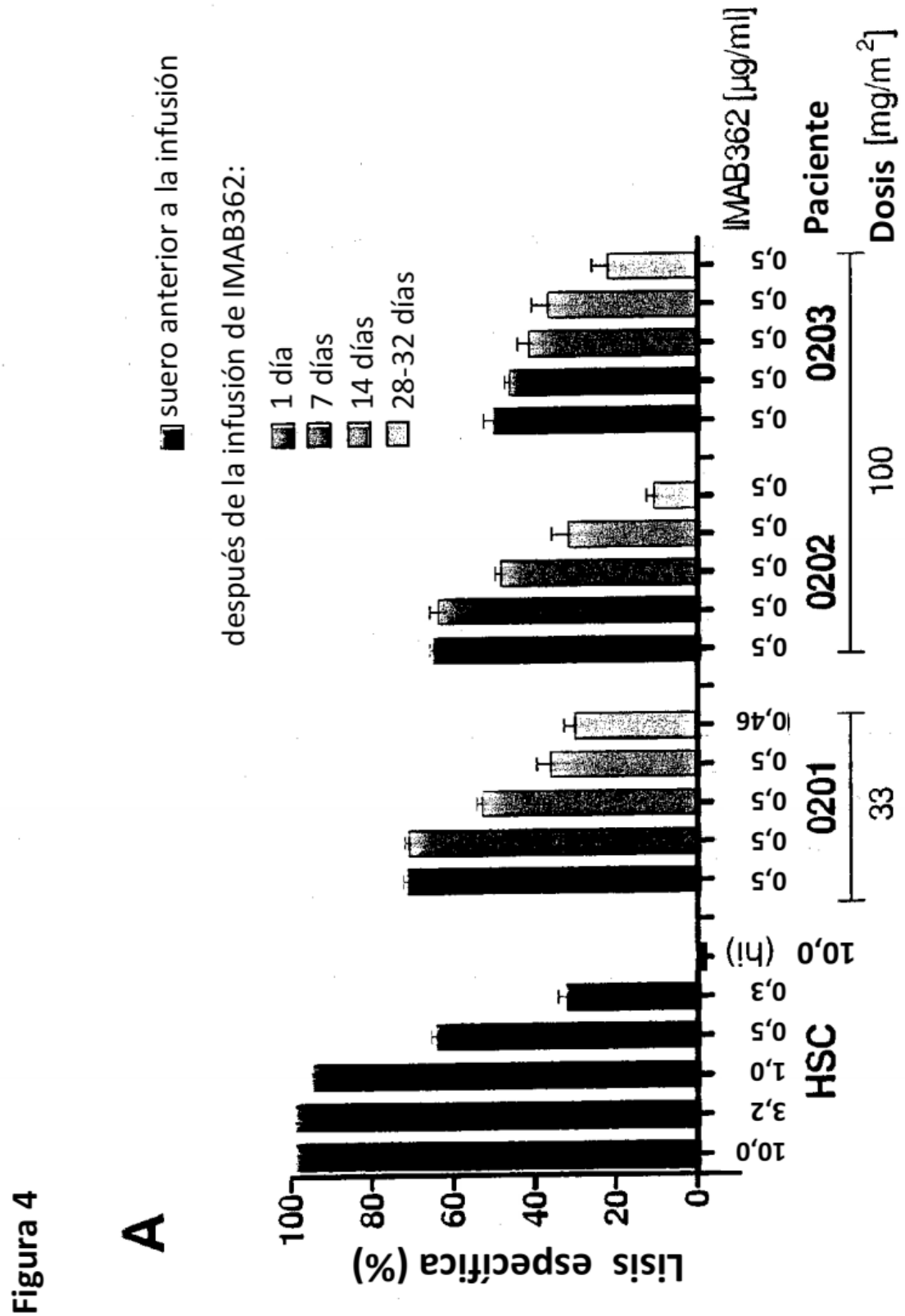

A
suero anterior a la infusión
después de la infusión de IMAB362:
1 día
7 días
14 días
28-32 días
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC
10,0
3,2
1,0
0,5
0,3
10,0 (hi)
0201
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
0,46
33
0202
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
100
0203
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
0,5
IMAB362 [µg/ml]
Paciente
Dosis [mg/m2]

Figura 4

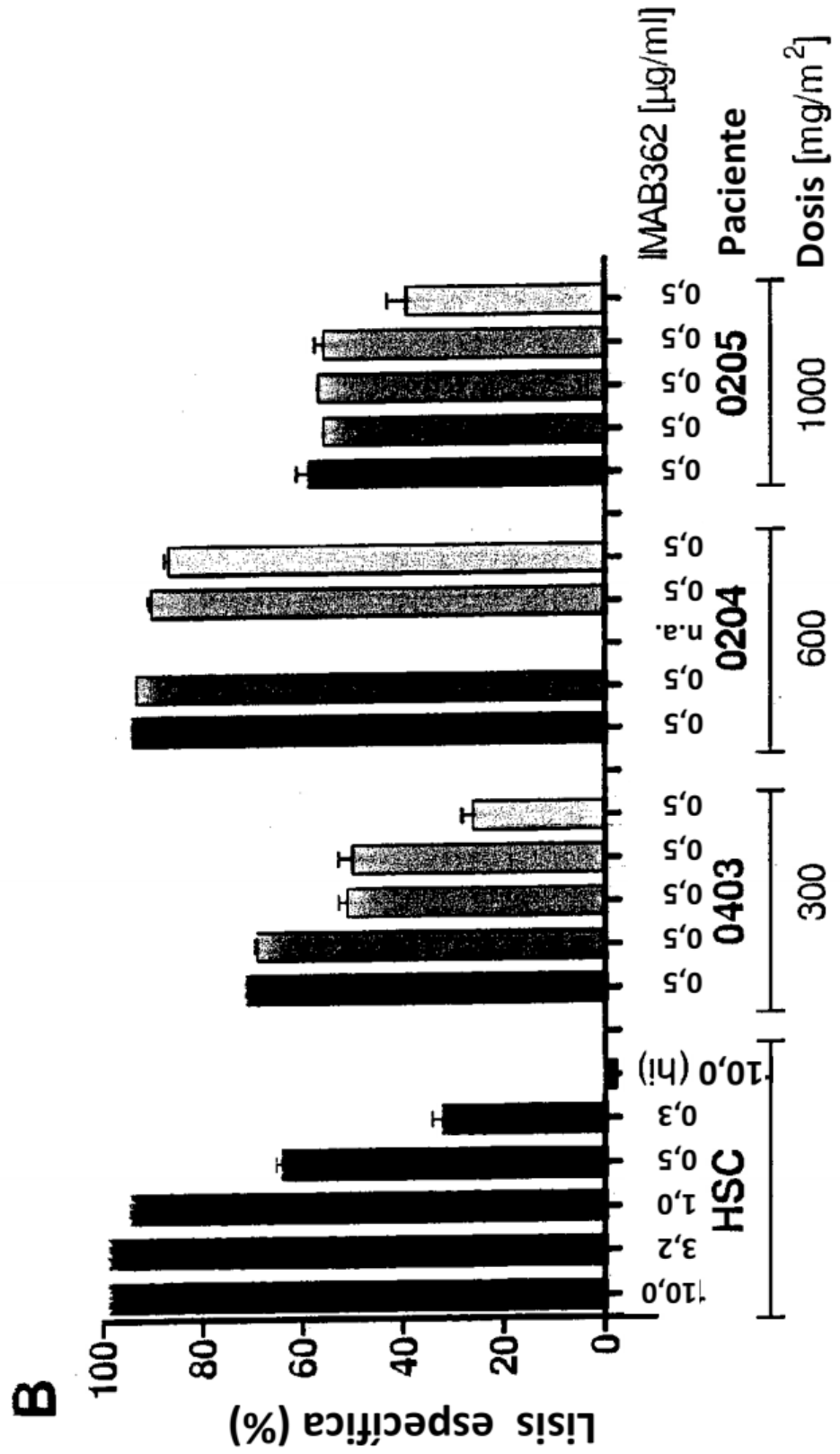

B
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC
Paciente
Dosis [mg/m²]
IMAB362 [µg/ml]
10,0
3,2
1,0
0,5
0,3
10,0 (hi)
0403
0204
0205
300
600
1000
n.a.

Figura 4

C

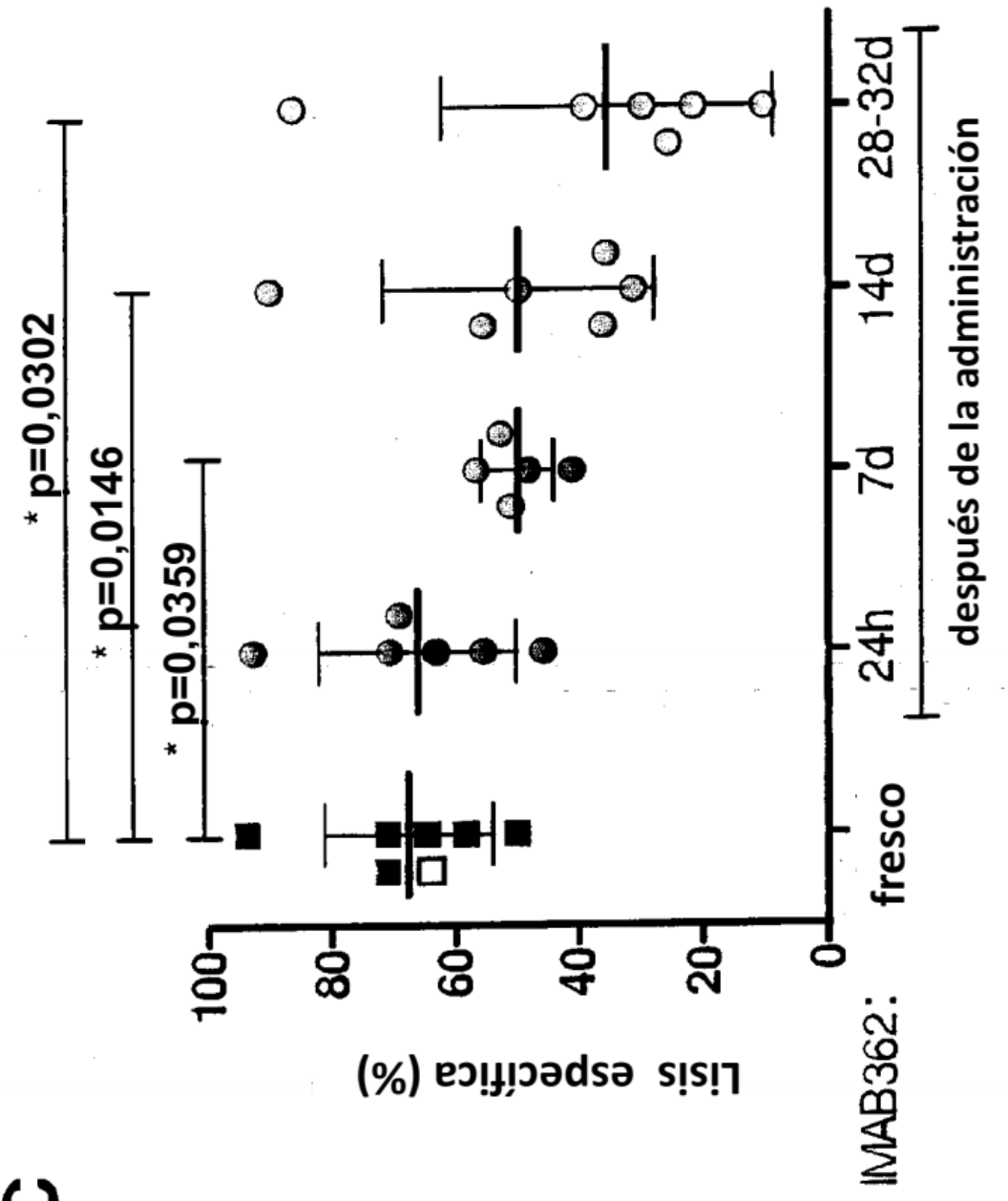

* p=0,0302
* p=0,0146
* p=0,0359
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
IMAB362:
fresco
24h
7d
14d
28-32d
después de la administración

Figura 5

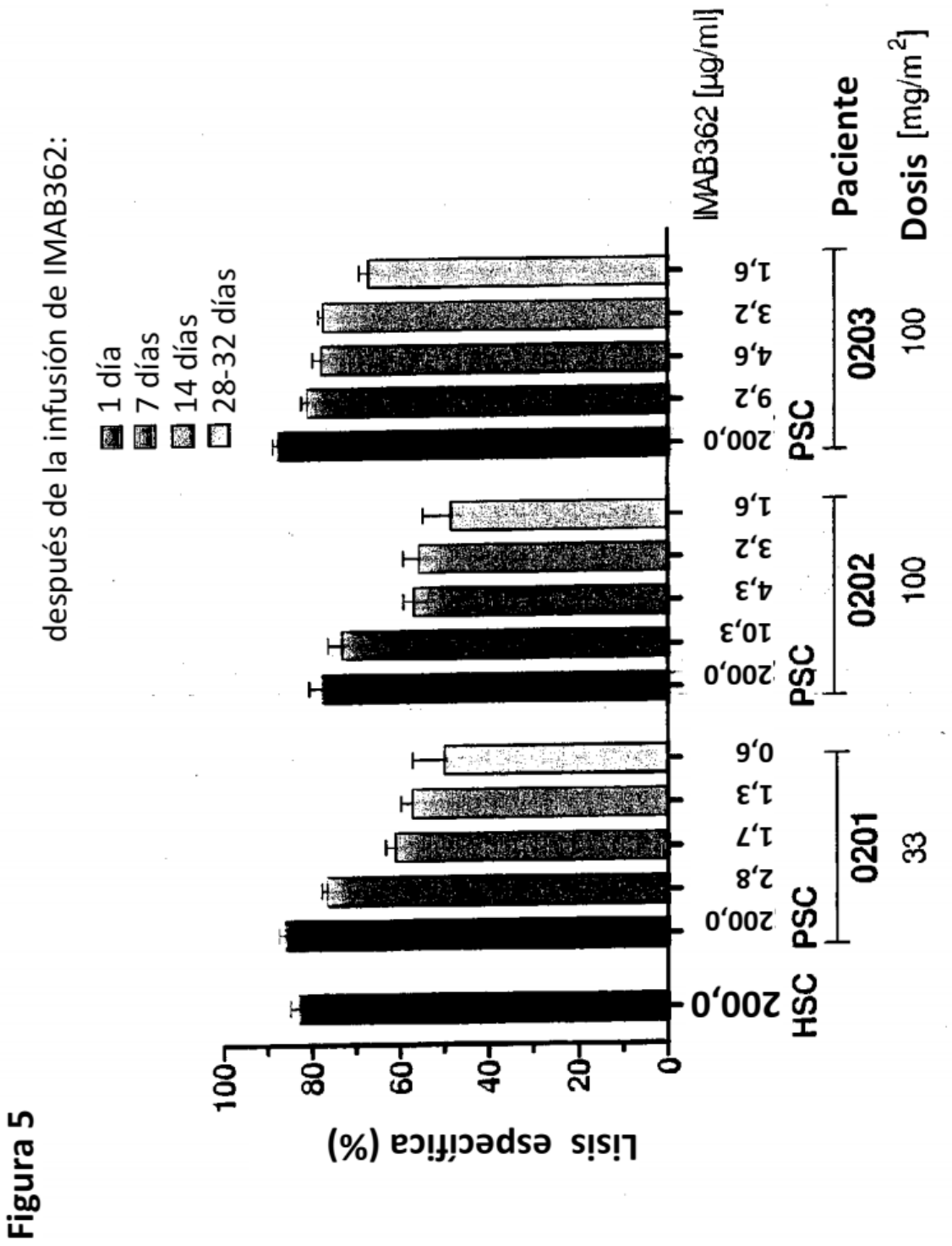

después de la infusión de IMAB362:
1 día
7 días
14 días
28-32 días
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
IMAB362 [µg/ml]
HSC
PSC
PSC
PSC
200,0
200,0
2,8
1,7
1,3
0,6
200,0
10,3
4,3
3,2
1,6
200,0
9,2
4,6
3,2
1,6
0201
0202
0203
Paciente
33
100
100
Dosis [mg/m²]

Figura 5

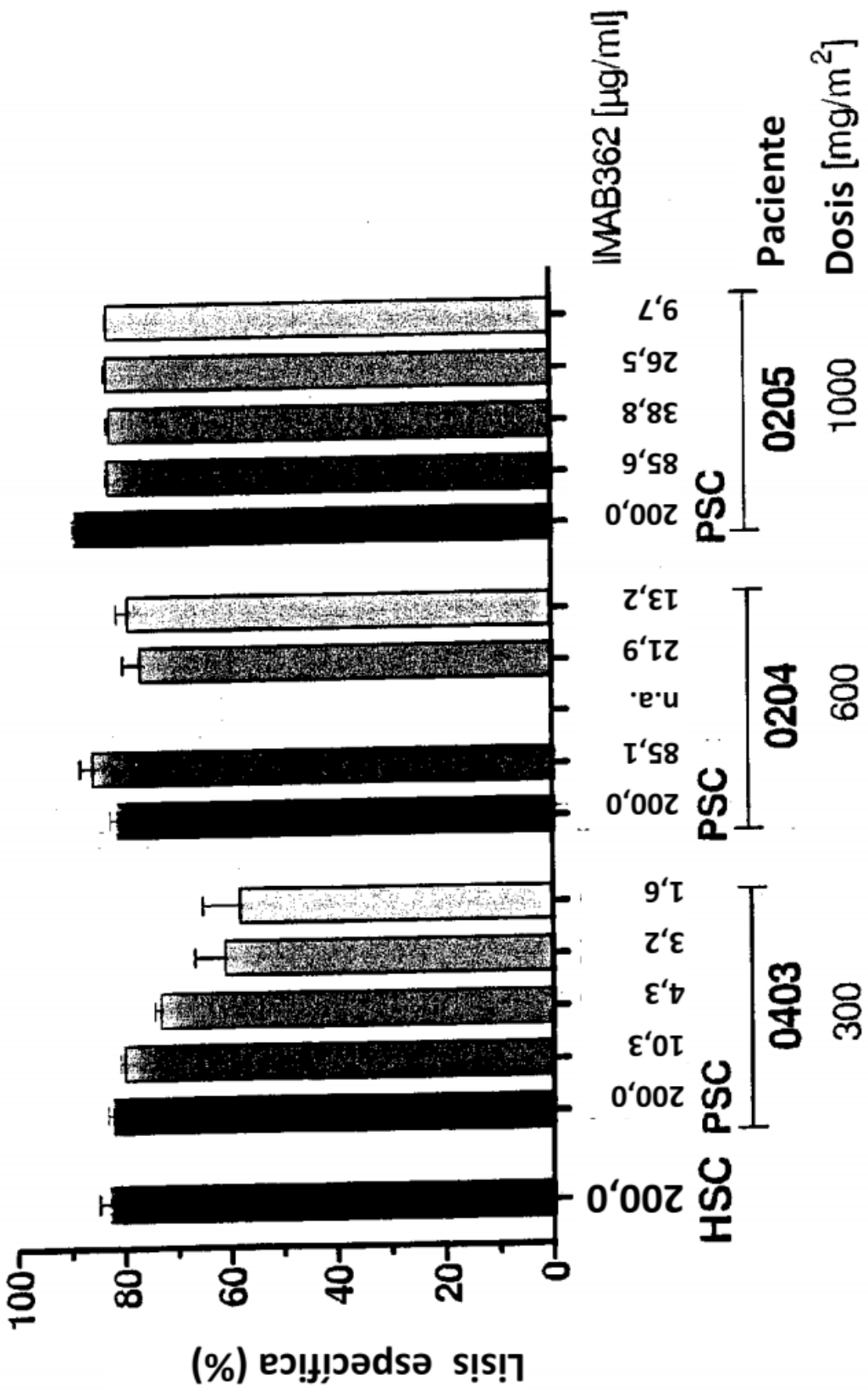

Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
IMAB362 [µg/ml]
HSC
200,0
PSC
200,0
10,3
4,3
3,2
1,6
0403
PSC
200,0
85,1
n.a.
21,9
13,2
0204
PSC
200,0
85,6
38,8
26,5
9,7
0205
Paciente
Dosis [mg/m2]
300
600
1000

Figura 6

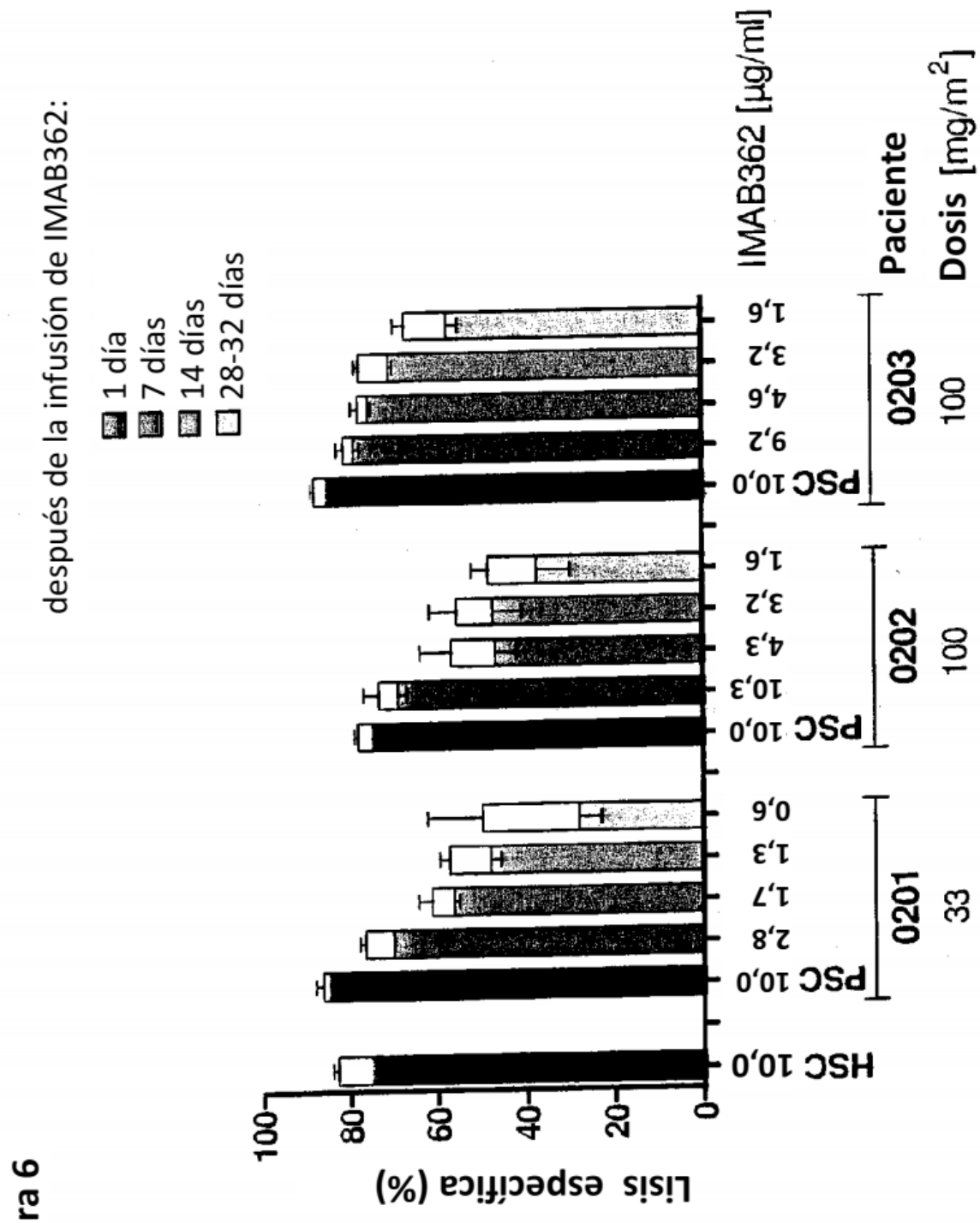

después de la infusión de IMAB362:
1 día
7 días
14 días
28-32 días
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC 10,0
PSC 10,0
2,8
1,7
1,3
0,6
0201
33
PSC 10,0
10,3
4,3
3,2
1,6
0202
100
PSC 10,0
9,2
4,6
3,2
1,6
0203
100
IMAB362 [µg/ml]
Paciente
Dosis [mg/m²]

Figura 6

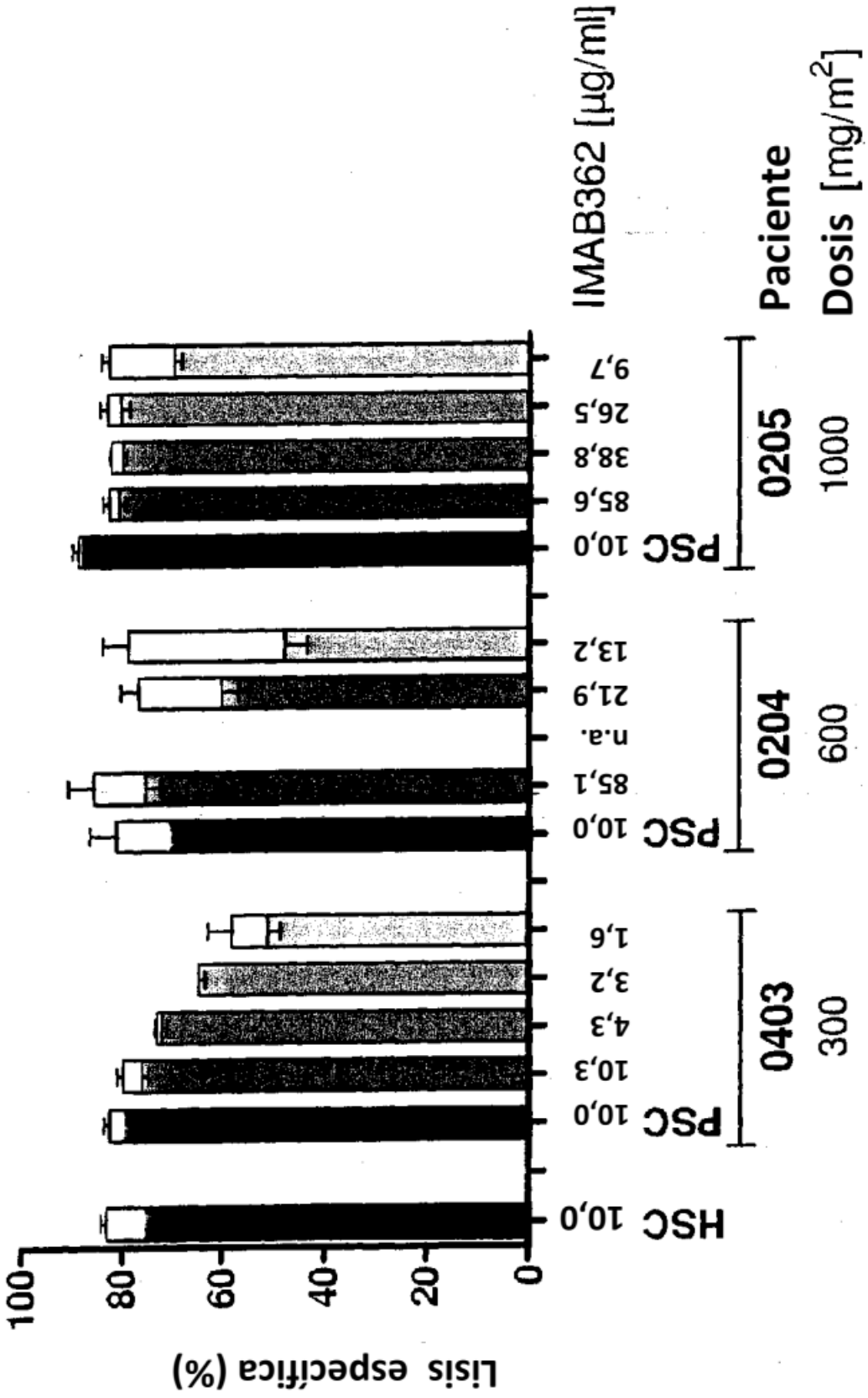

Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC 10,0
PSC 10,0
10,3
4,3
3,2
1,6
0403
300
PSC 10,0
85,1
n.a.
21,9
13,2
0204
600
PSC 10,0
85,6
38,8
26,5
9,7
0205
1000
IMAB362 [µg/ml]
Paciente
Dosis [mg/m²]

Figura 7

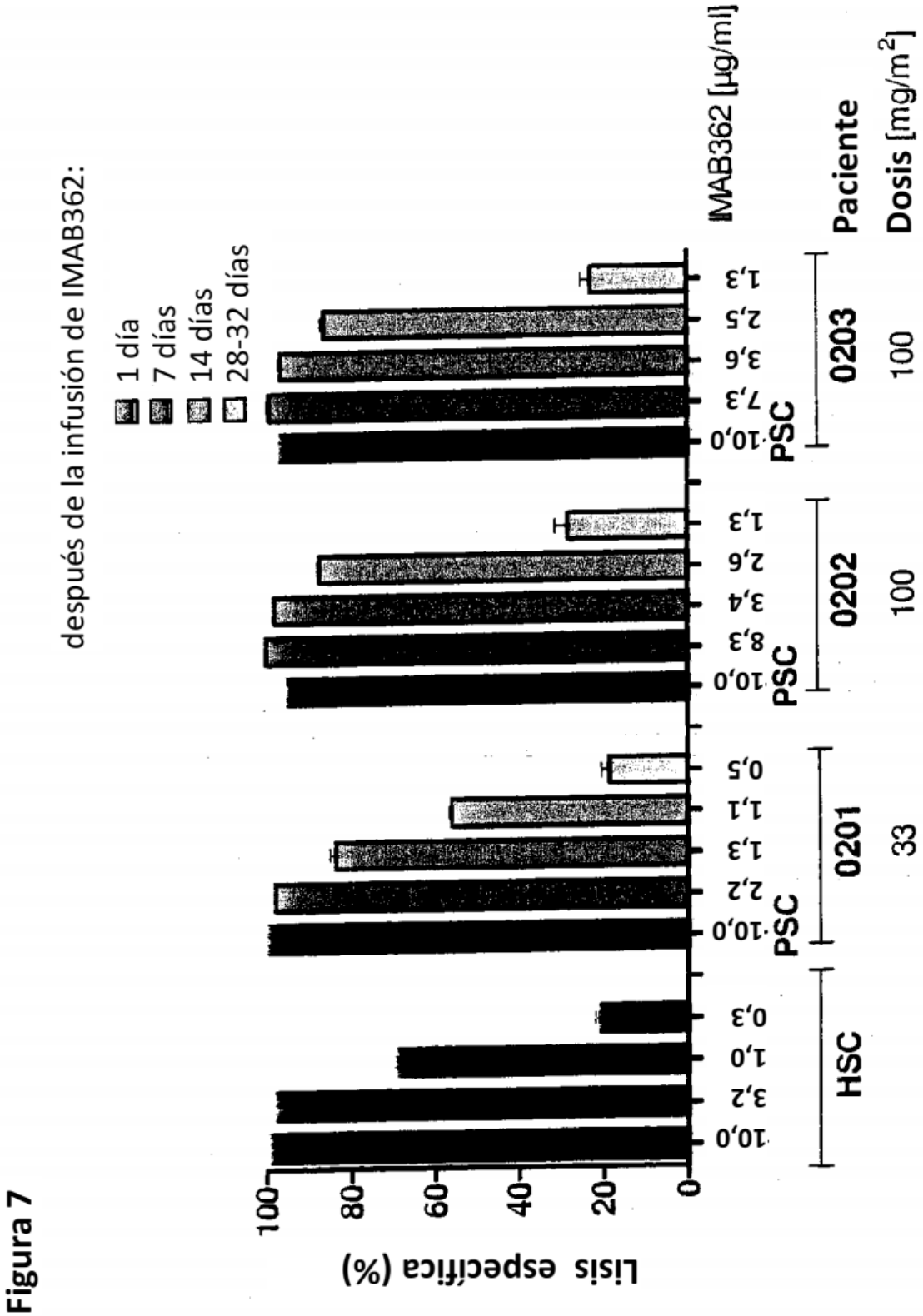

después de la infusión de IMAB362:
1 día
7 días
14 días
28-32 días
Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
IMAB362 [µg/ml]
10,0
3,2
1,0
0,3
10,0
2,2
1,3
1,1
0,5
10,0
8,3
3,4
2,6
1,3
10,0
7,3
3,6
2,5
1,3
HSC
PSC
0201
PSC
0202
PSC
0203
Paciente
33
100
100
Dosis [mg/m²]

Figura 7

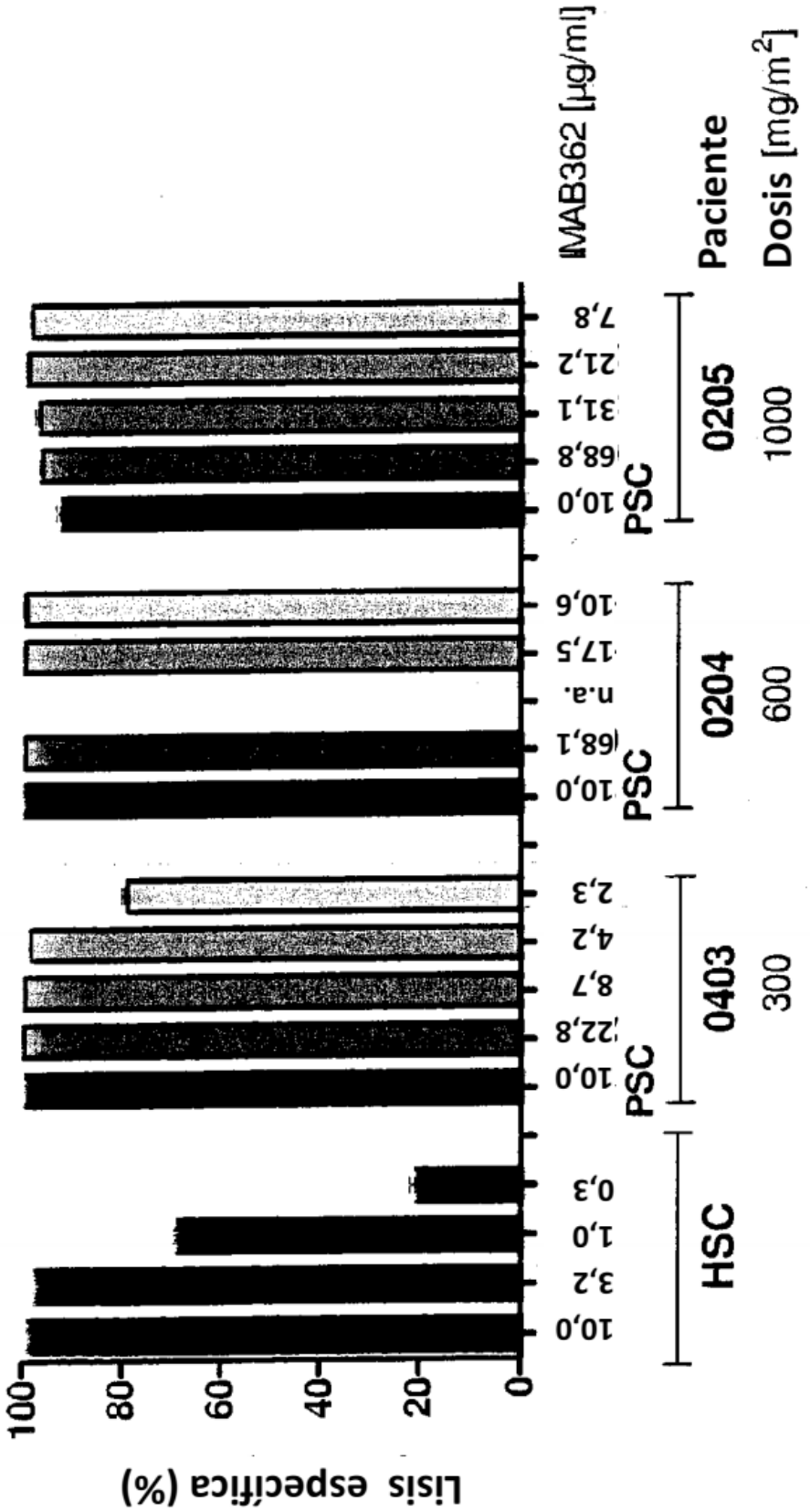

Lisis específica (%)
100
80
60
40
20
0
HSC
PSC
PSC
PSC
0403
0204
0205
300
600
1000
Dosis [mg/m²]
Paciente
MAB362 [µg/ml]
10,0
3,2
1,0
0,3
10,0
22,8
8,7
4,2
2,3
10,0
68,1
n.a.
17,5
10,6
10,0
68,8
31,1
21,2
7,8

Figura 8

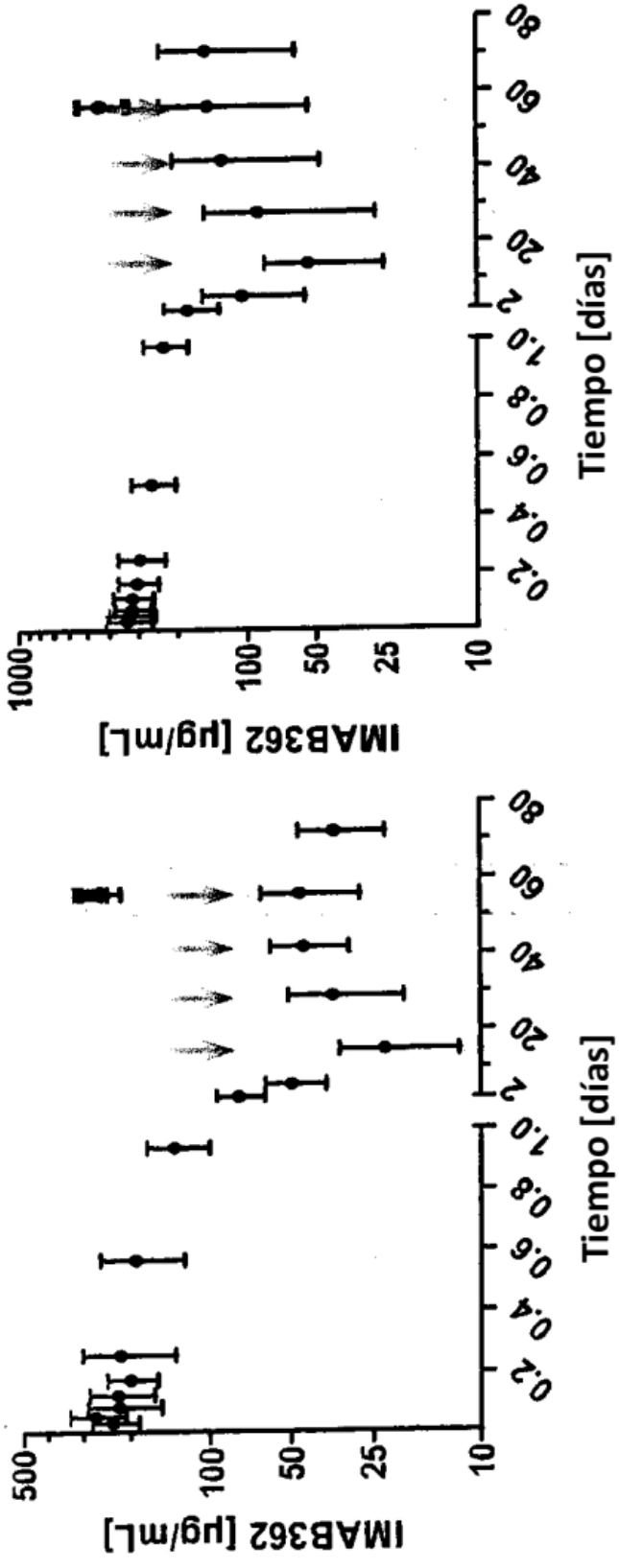

IMAB362 [µg/mL]
1000
100
50
25
10
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
2
20
40
60
80
Tiempo [días]
IMAB362 [µg/mL]
500
100
50
25
10
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
2
20
40
60
80
Tiempo [días]

Figura 9

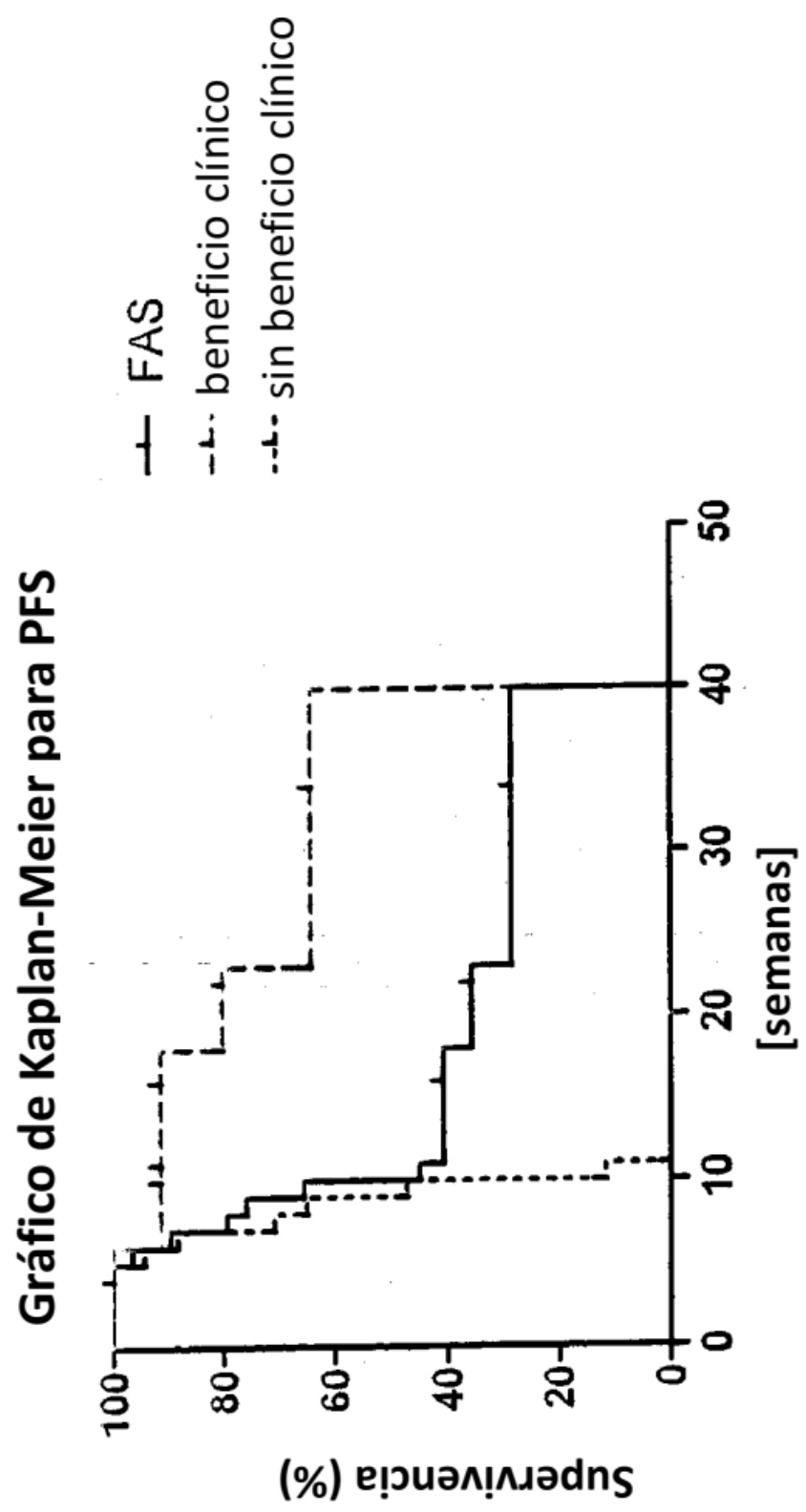


Gráfico de Kaplan-Meier para PFS
FAS
beneficio clínico
sin beneficio clínico
Supervivencia (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
[semanas]

Figura 10

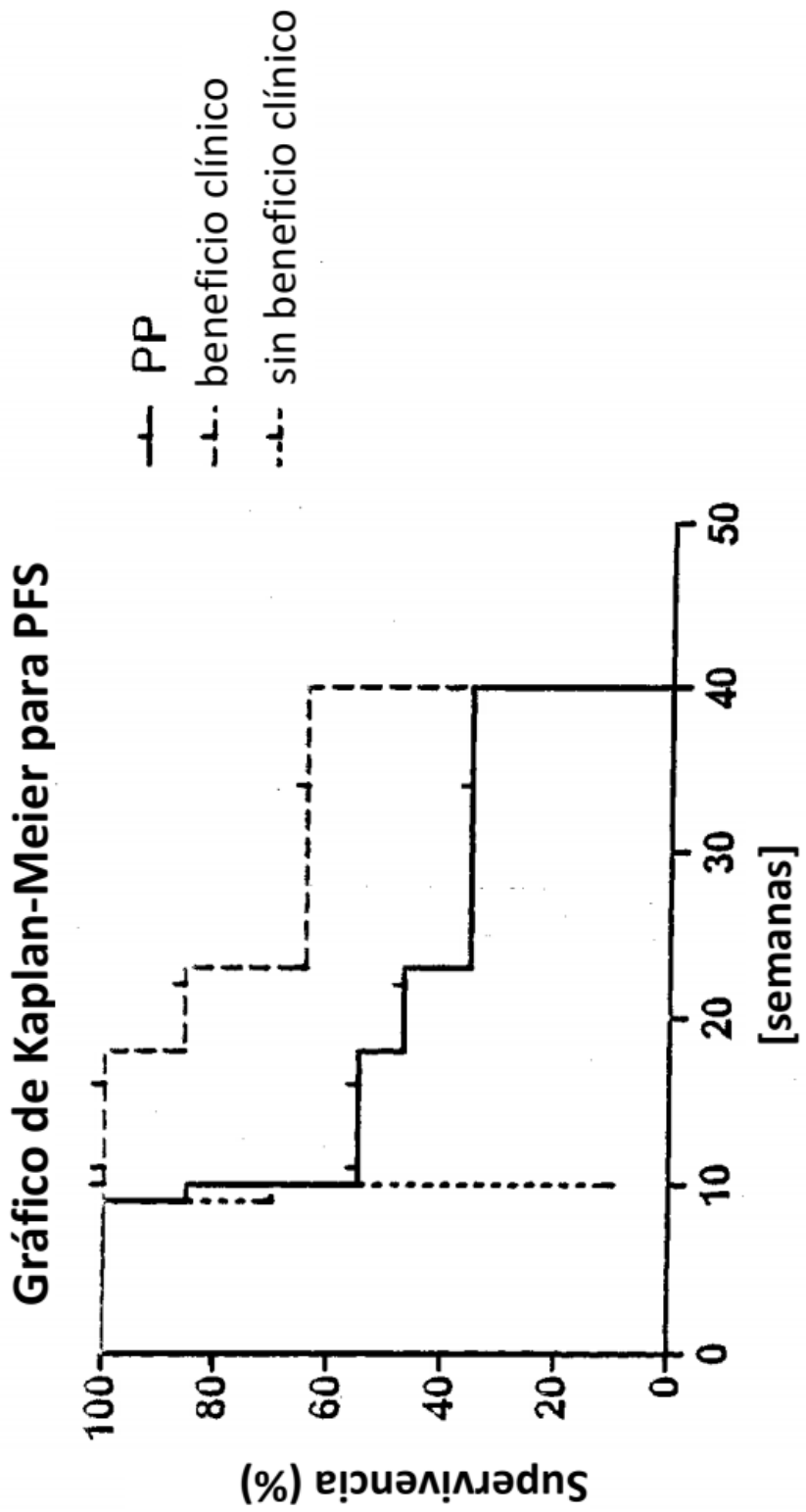


Gráfico de Kaplan-Meier para PFS
PP
beneficio clínico
sin beneficio clínico
Supervivencia (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
[semanas]