(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 989 943**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/30	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012** **E 18179328 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3421496**

(54) Título: **Anticuerpos para el tratamiento de un cáncer que expresa la Claudina 6**

(30) Prioridad:

13.05.2011 EP 11004004
13.05.2011 US 201161486071 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

(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 DERUNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

(72) Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
KOSLOWSKI, MICHAEL;
WALTER, KORDEN;
WÖLL, STEFAN;
KREUZBERG, MARIA;
HUBNER, BERND;
ERDELJAN, MICHAEL y
WEICHEL, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 989 943 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para el tratamiento de un cáncer que expresa la Claudina 6.

Los anticuerpos han sido introducidos con éxito en la clínica para la utilización en la terapia del cáncer y han emergido como la terapéutica más prometedora en oncología durante la última década. Las terapias basadas en los anticuerpos para el cáncer presentan el potencial de una especificidad más alta y un perfil de efectos secundarios más bajo que los fármacos convencionales. El motivo es una diferenciación precisa entre las células normales y las células neoplásicas por parte de los anticuerpos y el hecho de que su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, tales como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunitarias citotóxicas.

Las claudinas son proteínas integrales de membrana situadas dentro de las estrechas uniones de epitelio y endotelio. Se predice que las claudinas presentan cuatro segmentos transmembranales con dos bucles extracelulares y extremos N y C situados en el citoplasma. La familia de la claudina (CLDN) de proteínas transmembranales desempeña un papel crucial en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y podría desempeñar además una función en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular. La expresión diferencial de estas proteínas en células tumorales y normales, además de su localización membranal, las convierte en dianas atractivas para la inmunoterapia del cáncer y la utilización de terapéuticos basados en anticuerpos para la administración dirigida de las CLDN en la terapia del cáncer promete un nivel elevado de especificidad terapéutica.

Sin embargo, la aplicación clínica de los terapéuticos dirigidos de CLDN se enfrenta a varios obstáculos. La expresión ubicua de las CLDN en el cuerpo y el papel crítico de las CLDN en el mantenimiento de las uniones estrechas requiere especificidad de diana de los terapéuticos con diana en CLDN con el fin de maximizar la especificidad del tratamiento y de minimizar la toxicidad sistémica.

El documento WO 2010/094499 se refiere a la identificación de secuencias de ácido nucleico y aminoácidos que son características de los tejidos tumorales tales como los tejidos de tumor de ovario y de tumor de pulmones y que representan dianas para la terapia o el diagnóstico de enfermedades tumorales en un sujeto.

El documento WO 2009/087978 se refiere a anticuerpos anti-CLDN6 y a su utilización como agentes anticáncer. En particular, se describen los anticuerpos monoclonales denominados AB3-1, AE1-16, AE49-11 y AE3-20. Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos era específico para CLDN6 tal como demuestra el análisis de FACS en el ejemplo 5. El anticuerpo AE3-20 reaccionó con CLDN9, mientras que los anticuerpos AE1-16 y AE49-11 mostraron considerable reactividad con CLDN9 y también reaccionaron con CLDN4. La unión del anticuerpo AB3-1 a CLDN6 era tan fuerte como su unión a CLDN9. Se describe en el ejemplo 7 que el anticuerpo AE49-11 administrado en un modelo tumoral de ratón tendía a inhibir el crecimiento tumoral y presentaba un efecto de prolongación de la vida. Sin embargo, dada la inespecificidad del anticuerpo utilizado, sigue sin estar claro si los efectos descritos se deben a la unión del anticuerpo a CLDN6.

El documento WO 2010/094499 describe anticuerpos contra CLDN6 utilizados como marcador para detectar tumores de ovario y pulmón. El documento WO 2009/025759 describe un anticuerpo policlonal contra CLDN6 para su uso como herramienta de diagnóstico para comprobar si el virus de la hepatitis C entra en la célula hepática a través de CLDN6.

De esta manera, hasta hoy no se ha descrito ningún anticuerpo específico de CLDN6 que se una selectivamente a la superficie de las células que expresan CLDN6. Sin embargo, dicho anticuerpo específico resultaría necesario para los enfoques terapéuticos basados en anticuerpos que utilizan CLDN6 como diana.

La alineación de secuencias de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 mostradas en la figura 1 ilustra que existe un elevado grado de conservación de CLDN6 respecto a otras proteínas claudinas. Esta elevada homología de CLDN6 respecto a otras proteínas claudinas, en particular CLDN9 y CLDN4, y el hecho de que el documento WO 2009/087978 no consiguió proporcionar anticuerpos específicos de CLDN6 sugiere que podría no resultar posible producir anticuerpos de unión específica a CLDN6.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Resumen de la enseñanza

La presente divulgación proporciona enseñanzas que en algunos aspectos van más allá de la invención como tal, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Las enseñanzas se proporcionan para colocar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Dicha información técnica adicional que no cae dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no es parte de la

invención. En particular, los términos "realización" y "aspecto" no deben interpretarse como que se refieren necesariamente a una realización de la invención, a menos que la "realización" o el "aspecto" en cuestión caigan dentro del alcance de las reivindicaciones.

Los resultados experimentales dados a conocer en la presente memoria confirman que CLDN6 se expresa en diferentes células humanas de cáncer mientras que la expresión en los tejidos normales se limita a la placenta.

Además, la presente enseña para el primer tiempo describe la producción con éxito de anticuerpos específicos de CLDN6 capaces de unirse a la superficie de células intactas que expresan CLDN6. El análisis de FACS de células intactas que expresaban CLDN6 mostró la unión específica de anticuerpos anti-CLDN6 mientras que no se observó unión de células que expresaban otras proteínas claudinas, en particular CLDN3, CLDN4 y CLDN9, o de células que no expresaban ninguna de estas proteínas CLDN. De esta manera, la presente enseñanza demuestra inesperadamente que puede producirse un anticuerpo que realiza específicamente una reacción de antígeno-anticuerpo con CLDN6 sobre la superficie de las células que expresan CLDN6, pero que no realiza sustancialmente la reacción de antígeno-anticuerpo con otras claudinas altamente homólogas.

La presente enseñanza proporciona de manera general anticuerpos útiles como terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas a células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas, incluyendo enfermedades de tipo tumoral, en particular cánceres, tales como el cáncer de ovario, en particular el adenocarcinoma ovárico y el teratocarcinoma ovárico, el cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, el melanoma maligno, el cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, el sarcoma, en particular el sarcoma sinovial y el carcinosarcoma, el cáncer de los conductos biliares, el cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, el cáncer de riñón, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar, el cáncer de colon, el cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer de íleo, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma de íleo, el carcinoma embrionario testicular, el coriocarcinoma placentario, el cáncer cervical, el cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, el teratoma testicular y el cáncer testicular embrionario, el cáncer uterino, un tumor de células germinativas, tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas de testículo y las formas metastásicas de los mismos.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a la CLDN6 asociada a la superficie de una célula que expresa CLDN6. Preferentemente, el anticuerpo no es sustancialmente capaz de unirse a CLDN9 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN9. Preferentemente, el anticuerpo no es sustancialmente capaz de unirse a CLDN4 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN4 y/o no es sustancialmente capaz de unirse a CLDN3 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN3. Más preferentemente, el anticuerpo no es sustancialmente capaz de unirse a una proteína CLDN diferente de CLDN6 asociada a la superficie de una célula que expresa dicha proteína CLDN y es específica para CLDN6. Preferentemente, dicha célula que expresa dicha proteína CLDN es una célula intacta, en particular una célula no permeabilizada, y dicha proteína CLDN asociada a la superficie de una célula presenta una conformación natural, es decir, no desnaturalizada. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de unirse a uno o más epítopos de CLDN6 en su conformación natural.

En una forma de realización, el anticuerpo es capaz de unirse a un epítopo situado dentro de una parte extracelular de CLDN6, en la que dicha parte extracelular de CLDN6 preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7, más preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de unirse a un epítopo situado dentro de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7.

En una forma de realización, el anticuerpo es capaz de unirse a CLDN6 mediante la interacción en por lo menos uno, preferentemente más de uno, tal como 2, 3, 4 o 5, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Thr33, Phe35, Gly37, Ser39, Ile40 y Leu151, preferentemente mediante interacción con por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Thr33, Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40, más preferentemente mediante la interacción de por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Phe35, Gly37, Ser39 e Ile40 o que consiste de Thr33, Phe35, Gly37 y Ser39, y en particular, mediante la interacción con por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Phe35, Gly37 y Ser39.

Preferentemente, el anticuerpo no interacciona con uno o más, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Glu154, Ala155, Arg158 y Gly161, y preferentemente no

interacciona con uno o más, preferentemente todos los aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste de Arg158 y Gly161.

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

En una forma de realización, el anticuerpo es obtenible mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con un péptido que presenta la secuencia de aminoácidos de entre cualquiera de SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7 o un péptido inmunológicamente equivalente, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicho péptido.

En diferentes formas de realización, CLDN6, al que es capaz de unirse el anticuerpo, presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8. Resulta particularmente preferente que el anticuerpo sea capaz de unirse a CLDN6 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 y que sea capaz de unirse a CLDN6 que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende por lo menos una, preferentemente dos, más preferentemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena pesada de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 34, nº 36, nº 38 y nº 40, o una variante de las mismas. Las secuencias de CDR se han marcado con una caja en las secuencias de cadena pesada de anticuerpo indicadas anteriormente que se proporcionan en la figura 25.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, en la que Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, más preferentemente Phe o Tyr, más preferentemente Tyr; Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, más preferentemente Phe o Tyr, todavía más preferentemente Tyr, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente Leu o Phe, más preferentemente Leu. En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 o Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, un anticuerpo según las formas de realización anteriormente indicadas comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 según SEC ID nº 47 o una variante de la misma y/o la secuencia de CDR2 según SEC ID nº 48 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 34, nº 36, nº 38 y nº 40 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende por lo menos una, preferentemente dos, más preferentemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena ligera de anticuerpo seleccionadas de entre SEC ID nº 35, nº 37, nº 39 y nº 41, o una variante de las mismas. Las secuencias de CDR se han marcado con una caja en las secuencias de cadena ligera de anticuerpo anteriormente indicadas que se proporcionan en la figura 26.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, en la que Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, más preferentemente Ser; Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, más preferentemente Tyr, Ser o Asn, todavía más preferentemente Asn; y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Tyr, más preferentemente Tyr. En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR3 siguiente: Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en la que Xaa1, Xaa2 y Xaa3 son tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, un anticuerpo según las formas de realización anteriormente indicadas comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 según SEC ID nº 52 o una variante de la misma y/o la secuencia de CDR2 según SEC ID nº 53 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 35, nº 37, nº 39, nº 41, nº 54 y nº 55 o una variante de las mismas.

En diversas formas de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende una cadena pesada de anticuerpo tal como se ha comentado anteriormente y una cadena ligera de anticuerpo tal como también se ha comentado anteriormente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende por lo menos una, preferentemente dos, más preferentemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de SEC ID nº x, o una variante de las mismas, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende por lo menos una, preferentemente dos, más preferentemente las tres secuencias de CDR de una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de SEC ID nº
x+1, o una variante de la misma;

en la que x se selecciona de entre 34, 36, 38 y 40.

Las secuencias de CDR se han marcado con una caja en las secuencias de cadena pesada de anticuerpo y secuencias de cadena ligera de anticuerpo anteriormente indicadas, respectivamente, proporcionadas en las figuras 25 y 26, respectivamente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste de Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3, Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp, Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp y Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyr, en la que Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, más preferentemente Phe o Tyr, más preferentemente Tyr; Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido aromático, más preferentemente Phe o Tyr, todavía más preferentemente Tyr, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente Leu o Phe, más preferentemente Leu, e

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR3 seleccionada de entre el grupo que consiste de Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro, Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro, Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thr, en la que Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Asn, más preferentemente Ser, Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente Tyr, Ser, Ile, Asn o Thr, más preferentemente Tyr, Ser o Asn, todavía más preferentemente Asn, y Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente Ser o Tyr, más preferentemente Tyr.

En una forma de realización, un anticuerpo según las formas de realización anteriormente indicadas comprende (i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 según SEC ID nº 47 o una variante de la misma y/o la secuencia de CDR2 según SEC ID nº 48 o una variante de la misma, y/o (ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de CDR1 según SEC ID nº 52 o una variante de la misma y/o la secuencia de CDR2 según SEC ID nº 53 o una variante de las mismas.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 34, nº 36, nº 38 y nº 40 o una variante de las mismas, preferentemente SEC ID nº 36 o una variante de la misma, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 35, nº 37, nº 39, nº 41, nº 54 y nº 55 o una variante de las mismas, preferentemente SEC ID nº 35 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de SEC ID nº 36, o una variante de la misma, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo seleccionada de entre SEC ID nº 35, nº 54 y nº 55 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de SEC ID nº 36, o una variante de la misma, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de SEC ID nº 54 y 55 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de SEC ID nº: 36 o una variante de la misma, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de SEC ID nº 35 o una variante de la misma.

En una forma de realización, un anticuerpo de la enseñanza que comprende:

(i) una cadena pesada de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena pesada de anticuerpo de SEC ID nº x o una variante de la misma, y

(ii) una cadena ligera de anticuerpo que comprende una secuencia de cadena ligera de anticuerpo de SEC ID nº x+1 o una variante de la misma,

en al que x se selecciona de entre 34, 36, 38 y 40.

En formas de realización preferidas, un anticuerpo de la enseñanza, comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región constante de cadena pesada gamma-1, preferentemente una región constante de cadena pesada gamma-1 humana, tal como una secuencia tal como se indica en SEC ID nº 25 y/o que comprende una cadena ligera de anticuerpo que comprende una región constante de cadena ligera kappa, preferentemente una región constante de cadena ligera kappa humana, tal como una secuencia tal como se indica en SEC ID nº 27.

En formas de realización preferidas, el anticuerpo presenta una o más de las actividades siguientes: (i) eliminación de una célula que expresa CLDN6, (ii) inhibición de la proliferación de una célula que expresa CLDN6, (iii) inhibición de la formación de colonias de una célula que expresa CLDN6, (iv) mediación en la remisión, es decir, reducción del tamaño, preferentemente remisión completa, es decir, la desaparición total, de tumores establecidos, (v) prevención de la formación o nueva formación de tumores, y (vi) inhibición de la metástasis de una célula que expresa CLDN6. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el anticuerpo puede utilizarse para uno o más de lo anteriormente indicado, en particular al administrarlo en un paciente. Dicha eliminación de células y/o inhibición de una o más actividades de las células puede utilizarse terapéuticamente tal como se indica en la presente memoria. En particular, la eliminación de células, la inhibición de la proliferación de las células y/o la inhibición de la formación de colonias de células, pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención del cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer. La inhibición de la proliferación, de la formación de colonias y/o de la metástasis de células, pueden utilizarse, en particular, para el tratamiento o la prevención de la metástasis del cáncer y la extensión metastásica de las células de cáncer. Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza media en la eliminación de las células mediante la inducción de la lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la lisis mediada por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la apoptosis, la adhesión homotípica y/o la fagocitosis, preferentemente mediante la inducción de lisis mediada por CDC y/o la lisis mediada por ADCC. Sin embargo, la presente enseñanza incluye además formas de realización en las que el anticuerpo ejerce su actividad tal como se indica en la presente memoria, tal como la eliminación de células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, por ejemplo la proliferación celular y/o la formación de colonias, sin inducción de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis. Por ejemplo, el anticuerpo de la enseñanza puede ejercer además un efecto simplemente mediante la unión a CLDN6 sobre la superficie celular, de esta manera bloqueando, por ejemplo, la proliferación de las células. En una forma de realización, el anticuerpo de la enseñanza no induce la lisis mediada por CDC de las células.

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

La actividad de inhibición o reducción de la proliferación de las células que expresan CLDN6, preferentemente células de cáncer, puede medirse *in vitro* mediante la determinación de la proliferación de las células de cáncer que expresan CLDN6 en un ensayo utilizando bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un

nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse en el ADN de nueva síntesis de las células en replicación (durante la etapa S del ciclo celular), que es sustituido por timidina durante la replicación del ADN. La detección del grupo químico incorporado mediante la utilización de, por ejemplo, anticuerpos específicos para BrdU indica que las células se encontraban en replicación activa de su ADN.

La actividad de inhibición o reducción de la formación de colonias de células que expresan CLDN6, preferentemente células de cáncer, puede medirse *in vitro* en un ensayo clonogénico. Un ensayo clonogénico es una técnica microbiológica para estudiar la efectividad de agentes específicos sobre la supervivencia y proliferación de las células. Se utiliza frecuentemente en laboratorios de investigación del cáncer para determinar el efecto de fármacos o radiación sobre las células tumorales en proliferación. El experimento implica tres etapas principales: (i) aplicación de un tratamiento a una muestra de células, en particular células de cáncer, (ii) siembra en placa de las células en un recipiente de cultivo de tejidos, e (iii) dejar un periodo de tiempo para la multiplicación de las células. Las colonias producidas se fijan, se tiñen y se cuentan. La formación de colonias es importante con respecto a la formación de metástasis en el caso de que células tumorales individuales colonicen órganos. La actividad de inhibición de los anticuerpos indica su potencial de supresión de la formación de metástasis. Los anticuerpos con actividad de inhibición o reducción de la formación de colonias en un ensayo clonogénico resultan particularmente útiles para tratar o prevenir las metástasis y la extensión metastásica de las células de cáncer, en particular de los tipos de cáncer indicados en la presente memoria.

En formas de realización preferidas, el anticuerpo muestra una o más funciones efectoras inmunitarias contra una célula portadora de CLDN6 en su conformación natural, en la que una o más funciones efectoras inmunitarias se seleccionan preferentemente de entre el grupo que consiste de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación, preferentemente las funciones efectoras son ADCC y/o CDC.

Preferentemente dicha actividad o actividades o una o más funciones efectoras inmunitarias mostradas por dicho anticuerpo son inducidas por la unión de dicho anticuerpo a CLDN6, preferentemente un epítopo situado en una parte extracelular de CLDN6, en la que dicha parte extracelular de CLDN6 preferentemente comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de entre SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15, preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7, más preferentemente la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6.

Según la enseñanza, una célula que expresa CLDN6 es prefetentemenete caracterizada por la asociación de CLDN6 con la superficie celular. Una célula que expresa CLDN6 o una célula que porta CLDN6 en su conformación natural preferentemente es una célula tumoral, tal como una célula de cáncer, preferentemente una célula de cáncer de un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de cáncer ovárico, en particular adenocarcinoma ovárico y teratocarcinoma ovárico, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y el adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, el melanoma maligno, el cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, en particular el sarcoma sinovial y el carcinosarcoma, el cáncer de conductos biliares, el cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, el cáncer renal, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales pilar, el cáncer de colon, el cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer del íleo, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma del íleo, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma de íleo, el carcinoma embrionario testicular, el coriocarcinoma placentario, el cáncer cervical, el cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, el teratoma testicular y el cáncer testicular embrionario, el cáncer uterino , un tumor de células germinativas, tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas de testículo y las formas metastásicas de los mismos.

El anticuerpo de la enseñanza puede unirse a una o más fracciones efectoras terapéuticas, por ejemplo marcajes radioactivos, citotoxinas, enzimas terapéuticos, y agentes que inducen la apoptosis, con el fin de proporcionar una citotoxicidad dirigida, es decir, la eliminación de células tumorales.

En una forma de realización, el anticuerpo de la enseñanza (i) se une a las células que expresan CLDN6 y se caracteriza por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas, e (ii) no se une a células que no expresan CLDN6 y no se caracteriza por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas. El anticuerpo de la enseñanza preferentemente: (i) media en la eliminación y/o inhibición de la proliferación de las células que expresan CLDN6 y se caracteriza por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas, e (ii) no media en la eliminación y/o no inhibe la proliferación de las células que no expresan CLDN6 y no se caracteriza por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas.

En formas de realización preferidas particulares, el anticuerpo de la enseñanza se une a epítopos nativos de CLDN6 presentes sobre la superficie de las células vivas, tales como SEC ID nº 6 o nº 7. En formas de realización preferidas adicionales, el anticuerpo de la enseñanza es específico para células de cáncer que expresan CLDN6

y no se une a células de cáncer que no expresan CLDN6.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden derivarse de diferentes especies, incluyendo, aunque sin limitación, el ratón, la rata, el cobaya y el ser humano. Entre los anticuerpos de la enseñanza se incluyen además moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferentemente el ser humano, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, entre los anticuerpos de la enseñanza se incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con regiones constantes de y de marco de origen humano.

Entre los anticuerpos de la enseñanza se incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, y entre ellos se incluyen los anticuerpos IgG2a (por ejemplo IgG2a, κ, λ), IgG2b (por ejemplo IgG2b, κ, λ), IgG3 (por ejemplo IgG3, κ, λ) e IgM. Sin embargo, otros isotipos de anticuerpos también se encuentran comprendidos en la enseñanza, entre ellos los anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, y los anticuerpos secretorios IgA, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab, $F(ab')_2$, Fv, Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, entre los fragmentos de unión a antígeno se incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina-dominio de unión, que comprenden: (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que se encuentra fusionado con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, e (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina-dominio de unión se dan a conocer adicionalmente en los documentos nº US2003/0118592 y nº US2003/0133939.

El anticuerpo de la enseñanza es preferentemente un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo. Entre los anticuerpos de la enseñanza se incluyen los anticuerpos totalmente humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse en un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CLDN6 al someterse a recombinación V-D-J e intercambio de isotipos. Dicho animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales, tal como se da a conocer en el documento nº US 2003/0017534.

Los anticuerpos de la presente enseñanza preferentemente se disocian de CLDN6 con una constante de equilibrio de disociación (KD) de aproximadamente 1 a 100 nM o inferior. Preferentemente, los anticuerpos de la enseñanza no presentan reactividad cruzada con antígenos de superficie celular relacionados y, de esta manera, no inhiben su función.

En formas de realización preferida, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden caracterizarse por una o más de las propiedades siguientes:

a) especificidad para CLDN6;

b) una afinidad de unión a CLDN6 de aproximadamente 100 nM o inferior, preferentemente de entre aproximadamente 5 y 10 nM o inferior y, más preferentemente, de entre aproximadamente 1 y 3 nM o inferior,

c) la capacidad de inducir CDC de las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

d) la capacidad de inhibir la multiplicación de las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

e) la capacidad de inducir apoptosis de las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

f) la capacidad de inducir adhesión homotípica de las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

g) la capacidad de inducir ADCC de las células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que presenta células tumorales que expresa CLDN6 y se caracteriza por la asociación de CLDN6 son la superficie celular de las mismas;

i) la capacidad de eliminar células que expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas;

j) la capacidad de agregar CLDN6 sobre la superficie de las células vivas.

Un anticuerpo preferente indicado en la presente memoria es un anticuerpo producido o obtenible a partir de una célula de hibridoma depositada en el DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) y que presenta una de las denominaciones y números de acceso siguientes:

1. GT512muMAB 59A, nº de acceso DSM ACC3067, depositado el 21 de junio de 2010;
2. GT512muMAB 60A, nº de acceso DSM ACC3068, depositado el 21 de junio de 2010;
3. GT512muMAB 61D, nº de acceso DSM ACC3069, depositado el 21 de junio de 2010;
4. GT512muMAB 64A, nº de acceso DSM ACC3070, depositado el 21 de junio de 2010;
5. GT512muMAB 65A, nº de acceso DSM ACC3071, depositado el 21 de junio de 2010;
6. GT512muMAB 66B, nº de acceso DSM ACC3072, depositado el 21 de junio de 2010;
7. GT512muMAB 67A, nº de acceso DSM ACC3073, depositado el 21 de junio de 2010;
8. GT512muMAB 55A, nº de acceso DSM ACC3089, depositado el 31 de agosto de 2010; o
9. GT512muMAB 89A, nº de acceso DSM ACC3090, depositado el 31 de agosto de 2010.

Los anticuerpos de la enseñanza se denominan en la presente memoria haciendo referencia a la denominación del anticuerpo y/o haciendo referencia al clon productor del anticuerpo, por ejemplo muMAB 59A.

Son anticuerpos preferentes adicionales aquellos que presentan especificidad de los anticuerpos producidos y obtenibles de los hibridomas anteriormente indicados y, en particular, aquellos que comprenden una parte de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno, en particular una región variable, idéntica o altamente homóloga respecto a los anticuerpos producidos y obtenibles de los hibridomas anteriormente indicados. Se encuentra contemplado que los anticuerpos preferentes sean aquellos con regiones CDR idénticas o altamente homólogas respecto a las regiones de anticuerpos producidos y obtenibles de los hibridomas anteriormente indicados. La expresión "altamente homólogo" contempla la realización de entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, tal como entre 1 y 3 o 1 o 2 sustituciones en cada región CDR. Son anticuerpos particularmente preferentes las formas quimerizadas y humanizadas de los anticuerpos producidos y obtenibles de los hibridomas anteriormente indicados.

De esta manera, un anticuerpo de la enseñanza puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de: (i) un anticuerpo producido u obtenible de un clon depositado bajo el nº de acceso DSM ACC3067 (GT512muMAB 59A), DSM ACC3068 (GT512muMAB 60A), DSM ACC3069 (GT512muMAB 61D), DSM ACC3070 (GT512muMAB 64A), DSM ACC3071 (GT512muMAB 65A), DSM ACC3072 (GT512muMAB 66B), DSM ACC3073 (GT512muMAB 67A), DSM ACC3089 (GT512muMAB 55A) o DSM ACC3090 (GT512muMAB 89A); (ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo en (i); (iii) un anticuerpo que presenta la especificidad del anticuerpo en (i), e (iv) un anticuerpo que comprende la parte de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno del anticuerpo en (i). La parte de unión a antígeno o el sitio de unión a antígeno del anticuerpo en (i) puede comprender la región variable del anticuerpo en (i).

La presente enseñanza se refiere además a una célula, tal como una célula de hibridoma, que produce un anticuerpo tal como se indica en la presente memoria.

Son células de hibridoma preferentes las depositadas en el DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124, Braunschweig, Alemania) y que presenta una de las denominación y números de acceso siguientes:

1. GT512muMAB 59A, nº de acceso DSM ACC3067, depositado el 21 de junio de 2010;
2. GT512muMAB 60A, nº de acceso DSM ACC3068, depositado el 21 de junio de 2010;
3. GT512muMAB 61D, nº de acceso DSM ACC3069, depositado el 21 de junio de 2010;
4. GT512muMAB 64A, nº de acceso DSM ACC3070, depositado el 21 de junio de 2010;
5. GT512muMAB 65A, nº de acceso DSM ACC3071, depositado el 21 de junio de 2010;
6. GT512muMAB 66B, nº de acceso DSM ACC3072, depositado el 21 de junio de 2010;
7. GT512muMAB 67A, nº de acceso DSM ACC3073, depositado el 21 de junio de 2010;
8. GT512muMAB 55A, nº de acceso DSM ACC3089, depositado el 31 de agosto de 2010; o
9. GT512muMAB 89A, nº de acceso DSM ACC3090, depositado el 31 de agosto de 2010.

Los anticuerpos anti-CLDN6 de la presente enseñanza pueden derivatizarse, unirse o coexpresarse con otras especificidades de unión. En una realización particular, la enseñanza proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende por lo menos una primera especificidad de unión para CLDN6 (por ejemplo un anticuerpo anti-CLDN6 o mimético del mismo) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo un receptor de Fc-gamma, tal como Fc-gamma RI, o cualquier otro receptor de Fc) o un receptor de célula T, por ejemplo CD3.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CLDN6 como a un receptor de Fc o a un receptor de células T, por ejemplo CD3. Son ejemplos de receptores de Fc, el receptor de IgG, el receptor de Fc-gamma (FcγR), tal como FcγR(CD64), FcγRII(CD32) y FcγRIII(CD16). Otros receptores de Fc, tal como los receptores de IgA (por ejemplo

FcαRI) también pueden ser dianas. El receptor de Fc preferentemente se localiza sobre la superficie de una célula efectora, por ejemplo un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una forma de realización preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es diferente del sitio de unión de Fc de inmunoglobulina (por ejemplo IgG o IgA) del receptor. Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no resulta bloqueada por los niveles fisiológicos de las inmunoglobulinas.

En todavía otro aspecto, los anticuerpos anti-CLDN6 de la enseñanza se derivatizan, unen o coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo otro péptido o proteína (por ejemplo un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la enseñanza puede asociarse funcionalmente (por ejemplo mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) con una o más otras entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo para producir un inmunoconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente enseñanza puede unirse a otras fracciones terapéuticas, por ejemplo un isótopo radioactivo, un fármaco anticáncer de molécula pequeña, una citocina recombinante o una quimoquina. De acuerdo con lo anterior, la presente enseñanza comprende una gran diversidad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, la totalidad de las cuales se unen a las células que expresan CLDN6 y/o a las células que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas y que pueden utilizarse para dirigir otras moléculas a dichas células.

Generalmente, para los fines de la presente enseñanza, todos los derivados de anticuerpo, tales como los conjugados de anticuerpos, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y las proteínas de fusión indicadas en la presente memoria, se encuentran comprendidas en el término "anticuerpo".

En un aspecto adicional, la enseñanza contempla además proteínas de unión a CLDN6 derivadas de dominios no de inmunoglobulina. En particular proteínas de cadena sencilla. Dichas proteínas de unión y métodos para la producción de las mismas se describen en, por ejemplo, Binz *et al.*, Nature Biotechnology 23(10):1257-1268, 2005. Debe entenderse que la enseñanza proporcionada en la presente memoria con respecto a la inmunoglobulina o moléculas ligantes derivadas de inmunoglobulina se aplica también de manera correspondiente a moléculas ligantes derivadas de dominios no de inmunoglobulina. En particular, mediante la utilización de dichas moléculas ligantes derivadas de dominio no de inmunoglobulina resulta posible bloquear que CLDN6 de las células exprese dicha diana y que se caracterice por la asociación de dicha diana a la superficie celular y, de esta manera, que produzca los efectos terapéuticos dados a conocer en la presente memoria para los anticuerpos de la enseñanza, en particular la invención de una o más actividades de las células tumorales tal como se dan a conocer en la presente memoria, tal como la proliferación. Aunque no resulta necesario, resulta posible proporcionar funciones efectoras de anticuerpos a dichas moléculas ligantes no de inmunoglobulina, mediante, por ejemplo, fusión con la región Fc de los anticuerpos.

La presente enseñanza generalmente comprende el tratamiento y/o el diagnóstico de enfermedades, en particular enfermedades tumorales, mediante la localización de CLDN6 expresada por las células y que se asocia a la superficie de las células. Estos métodos proporcionan la detección y/o erradicación selectiva de dichas células, minimizando de esta manera los efectos adversos para las células normales que no expresan CLDN6 y que no se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas. Las enfermedades preferentes para una terapia o diagnóstico son aquellas en las que participan células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas, tales como enfermedades tumorales, en particular enfermedades de cáncer tales como las indicadas en la presente memoria.

En un aspecto, la enseñanza proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones/kits farmacéuticos y diagnósticos, que comprenden un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de la enseñanza. Una composición farmacéutica de la enseñanza puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente puede comprender uno o más adyuvantes, estabilizadores, etc. En una forma de realización particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a diferentes epítopos o que presentan características funcionales diferentes, tales como la inducción de CDC y/o ADCC y la inducción de apoptosis. En dicha forma de realización de la enseñanza, pueden utilizarse anticuerpos en combinación, por ejemplo en forma de una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLDN6. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLDN6 que presentan actividades diferentes aunque complementarias pueden combinarse en una única terapia para conseguir un efecto terapéutico deseado. En una forma de realización preferente, la composición incluye un anticuerpo anti-CLDN6 que media en la CDC en combinación con otro anticuerpo anti-CLDN6 que induce apoptosis. En otra forma de realización, la composición incluye un anticuerpo anti-CLDN6 que media en la eliminación altamente eficaz de células diana en presencia de células efectoras, en combinación con otro anticuerpo anti-CLDN6 que inhibe la multiplicación de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas.

La presente enseñanza incluye además la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-CLDN6 de la enseñanza, en la que preferentemente por lo menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-CLDN6 quimérico y por lo menos un anticuerpo adicional es un anticuerpo anti-CLDN6 humano, uniéndose

los anticuerpos a los mismos epítopos o a epítopos diferentes de CLDN6. Preferentemente se administra un anticuerpo de CLDN6 quimérico de la enseñanza en primer lugar, seguido de la administración de un anticuerpo anti-CLDN6 humano de la enseñanza, en el que el anticuerpo anti-CLDN6 humano preferentemente se administra durante un periodo de tiempo prolongado, es decir, en forma de terapia de mantenimiento.

Los anticuerpos, conjugados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas y composiciones de la presente enseñanza pueden utilizarse en una diversidad de métodos para inhibir la multiplicación de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas y/o que eliminan selectivamente células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas mediante la puesta en contacto de las células con una cantidad eficaz del anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición, de manera que se inhibe la multiplicación de la célula y/o se elimina la célula. En una forma de realización, el método incluye la eliminación de la célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de la misma, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo mediante CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis o mediante una combinación de dos o más de dichos mecanismos. Entre las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de las mismas, que pueden inhibirse o eliminarse utilizando los anticuerpos de la enseñanza se incluyen las células de cáncer.

Los anticuerpos, conjugados y moléculas biespecíficas/multiespecíficas y composiciones de la presente enseñanza pueden utilizarse para tratar y/o prevenir una diversidad de enfermedades que implican células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas, mediante la administración de los anticuerpos en pacientes que sufren dichas enfermedades. Entre las enfermedades ejemplares que pueden tratarse (por ejemplo mejorar) o impedirse se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las enfermedades tumorigénicas. Entre los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o impedirse se incluyen enfermedades de cáncer, tales como el cáncer ovárico, en particular el adenocarcinoma ovárico y el teratocarcinoma ovárico, el cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y el adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, el melanoma maligno, el cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, el sarcoma, en particular el sarcoma sinovial y el carcinosarcoma, el cáncer de conductos biliares, el cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, el cáncer de riñón, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar, el cáncer de colon, el cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer del íleo, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma del íleo, el carcinoma embrionario testicular, el coriocarcinoma placentario, el cáncer cervical, el cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, el teratoma testicular y el cáncer embrionario testicular, el cáncer uterino, un tumor de células germinativas tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas del testículo, y las formas metastásicas de los mismos.

En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas, que comprende administrar en un sujeto el anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición de la enseñanza. Preferentemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad de tipo tumoral y en formas de realización particulares se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer ovárico, en particular adenocarcinoma ovárico y teratocarcinoma ovárico, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y el adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, el cáncer gástrico, el cáncer de mama, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, el melanoma maligno, el cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, el sarcoma, en particular el sarcoma sinovial y el carcinosarcoma, el cáncer de conductos biliares, el cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, el cáncer de riñón, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar, el cáncer de colon, el cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer del íleo, en particular el adenocarcinoma de intestino delgado y el adenocarcinoma del íleo, el carcinoma embrionario testicular, el coriocarcinoma placentario, el cáncer cervical, el cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, el teratoma testicular y el cáncer embrionario testicular, el cáncer uterino, un tumor de células germinativas tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas del testículo, y las formas metastásicas de los mismos. CLDN6 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

La enseñanza puede implicar la utilización de los agentes y composiciones indicados en la presente memoria para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades tumorales, es decir, para tratar un paciente que presenta una enfermedad tumoral o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad tumoral. En un aspecto, la enseñanza proporciona métodos para inhibir el crecimiento tumoral que comprenden la administración de uno o más de los agentes y composiciones indicados en la presente memoria.

Preferentemente, los agentes y composiciones indicados en la presente memoria se administran de manera que

la sustancia terapéuticamente activa no se administre o no se administre sustancialmente en un tejido u órgano en el que las células en el caso de que el tejido u órgano se encuentre libre de tumores exprese CLDN6 y se caracterice por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas, tal como el tejido placentario o la placenta. Con este fine los agentes y composiciones indicados en la presente memoria pueden administrarse localmente.

En un aspecto, la enseñanza proporciona un anticuerpo tal como se indica en la presente memoria para la utilización en los métodos de tratamiento indicados en la presente memoria. En una forma de realización, la enseñanza proporciona una composición tal como se indica en la presente memoria para la utilización en los métodos de tratamiento indicados en la presente memoria.

En una forma de realización particular de la enseñanza, el sujeto en el que se administra el anticuerpo es tratado adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que module, por ejemplo incremente o inhiba, la expresión o la actividad de un receptor de Fc, por ejemplo un receptor de Fc-gamma, tal como una citocina. Entre las citocinas típicas para la administración durante el tratamiento se incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (FNT). Entre los agentes terapéuticos típicos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorrubicina, cisplatino, taxotere, 5-fluorouracilo, metotrexato, gemcitabina y ciclofosfamida.

En todavía otro aspecto, la enseñanza se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos, tales como ratones con CLDN6 humanos o un fragmento peptídico del mismo con el fin de obtener anticuerpos. Los péptidos preferentes para la inmunización son los seleccionados de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15, y péptidos inmunológicamente equivalentes.

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

De acuerdo con lo anterior, en todavía otro aspecto, la enseñanza proporciona células B aisladas, de un animal no humano tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, las células B aisladas pueden inmortalizarse mediante fusión con una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos de la enseñanza. Dichos hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la enseñanza) también están incluidos dentro del alcance de la enseñanza.

En un aspecto adicional, la presente enseñanza se refiere a métodos de diagnóstico, detección o seguimiento de una enfermedad tumoral, comprendiendo la detección y/o la determinación de la cantidad de CLDN6 o células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie de las mismas en una muestra biológica aislada de un paciente utilizando un anticuerpo de la enseñanza. La muestra biológica puede aislarse de un paciente que presenta una enfermedad tumoral, que se sospecha que presenta o que puede llegar a presentar una enfermedad tumoral o que presenta un potencial de enfermedad tumoral.

En una forma de realización del método de diagnóstico, detección o seguimiento de una enfermedad tumoral según la enseñanza, una muestra biológica y/o una muestra de control/referencia procede de un tejido u órgano correspondiente al tejido u órgano que debe diagnosticarse, detectarse o monitorizarse con respecto a si se encuentra afectada por una enfermedad tumoral, por ejemplo la enfermedad tumoral que debe diagnosticarse, detectarse o monitorizarse es cáncer ovárico y la muestra biológica y/o la muestra de control/referencia es tejido ovárico. Dichos tejidos y órganos se indican en la presente memoria por ejemplo en conexión a diferentes enfermedades tumorales y cánceres.

En una forma de realización de los métodos de diagnóstico, detección o seguimiento de una enfermedad tumoral, la muestra biológica es de un tejido u órgano en el que las células en el caso de que el tejido u órgano se encuentre libre de tumores no expresan sustancialmente CLDN6 y no se caracterizan por una asociación sustancial de CLDN6 con la superficie celular de las mismas. Preferentemente dicho tejido es un tejido diferente del tejido placentario.

Típicamente, el nivel de una molécula diana en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en el que una desviación respecto de dicho nivel de referencia es indicativa de la presencia y/o estadio de una enfermedad tumoral en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel según se determina en una muestra de control (por ejemplo de un tejido o sujeto sano) o una mediana de nivel de los sujetos sanos. Una "desviación" respecto de dicho nivel de referencia se refiere a cualquier cambio significativo, tal como un incremento o una reducción de por lo menos 10%, 20% o 30%, preferentemente de por lo menos 40% o 50% o incluso superior. Preferentemente, la presencia de CLDN6 o de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación

de CLDN6 con la superficie celular de las mismas en dicha muestra biológica o una cantidad de CLDN6 o de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas en la muestra biológica, que se encuentra incrementada respecto a un nivel de referencia indica la presencia de una enfermedad tumoral.

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

En un aspecto particular, la enseñanza se refiere a un método para la detección, es decir, la determinación de la posición o sitio, de una enfermedad tumoral, por ejemplo un tejido u órgano particular, que comprende administrar un anticuerpo de la presente enseñanza que se acopla con un marcaje detectable en un paciente. El marcaje de un tejido u órgano en dicho paciente podría indicar la presencia o riesgo de una enfermedad tumoral en dicho tejido u órgano.

Tal como se ejemplifica en la presente memoria, pueden obtenerse anticuerpos de la enseñanza directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo o puede clonarse y expresarse recombinantemente en una célula huésped (por ejemplo una célula CHO o una célula linfocítica). Son ejemplos adicionales de células huésped microorganismos tales como *E. coli*, y hongos, tales como levaduras. Alternativamente, pueden producirse recombinantemente en un animal no humano o planta transgénico. Sin embargo, la presente enseñanza contempla además formas de realización en las que los anticuerpos se producen mediante inmunización o vacunación utilizando estrategias de inmunización tales como las dadas a conocer en la presente memoria *in situ* en un paciente.

La presente enseñanza se refiere además a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo una cadena de anticuerpo, tal como se indica en la presente memoria. Los ácidos nucleicos pueden encontrarse comprendidos en un vector, por ejemplo un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector, utilizado convencionalmente en, por ejemplo, ingeniería genética. El vector puede comprender genes adicionales, tales como genes marcadores, que permitan la selección del vector en una célula huésped adecuada y bajo condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de la expresión que permitan la expresión correcta de las regiones codificantes en huéspedes adecuados. Dichos elementos de control son conocidos por el experto en la materia y pueden incluir un promotor, un casete de procesamiento y un codón de inicio de traducción.

Preferentemente, el ácido nucleico de la enseñanza se une operativamente a las secuencias de control de la expresión anteriormente indicadas, permitiendo la expresión en células eucarióticas o procarióticas. Los elementos de control que garantizan la expresión en células eucarióticas o procarióticas son bien conocidos por el experto en la materia.

Los métodos de construcción de moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente enseñanzam para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente indicadas, para la introducción de los vectores en células huésped adecuadamente seleccionadas, a fin de provocar o conseguir la expresión son bien conocidos de la técnica.

Un aspecto adicional de la presente enseñanza se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector tal como se da a conocer en la presente memoria.

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

Breve descripción de los dibujos

La figura 1. Alineación de secuencias de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9.

La figura 2. Análisis de inmunofluorescencia de sueros obtenidos de ratones inmunizados para producir anticuerpos específicos de CLDN6.

(A) Se sondearon células CHO-K1 no fijadas, cotransfectadas con ácidos nucleicos codificantes de CLDN6 y PFV humanos, respectivamente, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CLDN6 (R&D Systems, MAB3656). CLDN6 se localiza en la membrana plasmática de las células transfectadas y puede ser localizado sobre las células vivas por anticuerpos específicos.

(B) El suero de un ratón a partir del cual se produjo el hibridoma F3-6C3-H8 que contenía anticuerpos ligantes de CLDN6 sobre la superficie de células CHO-K1 no fijadas cotransfectadas con ácidos nucleicos codificantes de CLDN6 y PFV humanos.

La figura 3. Análisis de transferencia western para el ensayo de la expresión endógena de proteínas claudina

en células HEK293T.

Se sometieron a ensayo lisados de proteínas de células HEK293T transfectadas con ácidos nucleicos codificantes de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o transfectadas simuladamente, mediante transferencia western utilizando anticuerpos disponibles comercialmente anti-CLDN3(A) (Invitrogen, nº de cat. 34-1700), anti-CLDN4(A) (Zymed, 32-9400), anti-CLDN6(A) (ARP, 01-8865) y anti-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672). Los anticuerpos detectaron la expresión de sus dianas correspondientes únicamente en los transfectantes HEK293T respectivos. No se observó expresión endógena de ninguna de estas claudinas en células HEK293T no transfectadas.

La figura 4. Análisis de citometría de flujo para el ensayo de la especificidad de anticuerpos anti-CLDN disponibles comercialmente.

La unión de los anticuerpos anti-CLDN disponibles comercialmente a las células HEK293T transfectadas con ácidos nucleicos codificantes de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o no transfectadas, se determinó mediante citometría de flujo. Únicamente el anticuerpo disponible comercialmente anti-CLDN3 es específico para su diana.

La figura 5. Análisis de citometría de flujo para el ensayo de la especificidad de los anticuerpos anti-CLDN preparados según la enseñanza.

La unión de anticuerpos en sobrenadantes de subclones de hibridoma monoclonal a células HEK293T cotransfectadas con un vector codificante de CLDN6, CLDN3, CLDN4 o CLDN9 y un vector codificante de un marcador de fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo.

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

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

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

La unión de anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6, 3, 4 y 9 humanos y la variante PNU (polimorfismo de nucleótido único) de CLDN6 I143V se analizó mediante citometría de flujo utilizando células HEK293T que expresaban transitoriamente la claudina humana correspondiente. Se cotransfectaron HEK293T con un marcador de fluorescencia para distinguir entre las células no transfectadas (poblaciones Q1 y Q3) y las transfectadas (poblaciones Q2 y Q4). La concentración de anticuerpo utilizada fue la concentración que saturaba la unión a CLDN6 (25 µg/ml). La expresión de CLDN6, 3, 4 y 9 humanas y de CLDN6-PNU(I143V) se confirmó utilizando anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente contra la claudina-6 humana (R&D Systems, MAB3656), la claudina-3 humana (R&D Systems, MAB4620) y la claudina-4 humana (R&D Systems, MAB4219).

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

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

La figura 8. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A.

Se analizó la actividad de CDC de los anticuerpos anti-CLDN6 utilizando un ensayo dependiente de luciferasa para detectar ATP endógeno dentro de las células no lisadas. Por lo tanto, las células CHO-K1 que expresaban establemente CLDN6 humano se trataron con diferentes concentraciones de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A,

66B y 67A. Los anticuerpos MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron actividad de CDC dependiente de la dosis e indujeron CDC a concentraciones bajas.

La figura 9. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B sobre células con expresión endógena de CLDN6 NEC8 y NEC8 LVTS2 54 (con inactivación de CLDN6).

Los anticuerpos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B indujeron CDC en células NEC8 de una manera dependiente de la dosis. Se demostró la especificidad de diana de muMAB 65A y 66B mediante la utilización de células NEC8 LVTS2 54 (inactivación de CLDN6).

La figura 10. Efecto terapéutico de muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz utilizando ratones injertados con la línea de células tumorales NEC8.

El modelo utilizó xenoinjertos NEC8 expresantes endógenamente de CLDN6 en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. En comparación con el grupo de control salino, muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ratones injertados con células NEC8.

La figura 11. Especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A.

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

La figura 12. Afinidades relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A contra las células HEK293-CLDN6.

Con el fin de determinar las afinidades relativas, se analizó mediante citometría de flujo la unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6 humano expresado establemente sobre la superficie de las células HEK293. En el experimento de saturación de unión, se representó la concentración de los anticuerpos frente a las señales de FACS (mediana de la intensidad de fluorescencia). Se calculó la EC50 (concentración de anticuerpo que se une a la mitad de los sitios de unión en el equilibrio) mediante regresión no lineal. Los anticuerpos específicos de CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 450 a 600 ng/ml) y se alcanzó la saturación de unión a concentraciones bajas. Los anticuerpos quimAB 67A y 61D mostraron valores de EC50 bajos (EC50: 1.000 ng/ml) y medios (EC50 2.300 ng/ml), respectivamente.

La figura 13. Afinidades relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A para las células NEC8.

Con el fin de determinar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 para las células tumorales que expresan endógenamente CLDN6 humano, se analizó mediante citometría de flujo la unión a la línea celular de cáncer testicular NEC8. Los anticuerpos específicos para CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 600 a 650 ng/ml) y se alcanzó la saturación de unión a concentraciones bajas, mientras que quimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 intermedios (EC50: 1.700 ng/ml) y altos (EC50: 6.100 ng/ml), respectivamente.

La figura 14. Afinidades relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A para las células OV90.

Con el fin de determinar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 para las células tumorales que expresan endógenamente CLDN6 humano, se analizó mediante citometría de flujo la unión a la línea celular ovárico OV90. Los anticuerpos específicos de CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 550 a 600 ng/ml) y se alcanzó la saturación de unión a concentraciones bajas. QuimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 intermedios (EC50: 1.500 ng/ml y EC50: 2.300 ng/ml, respectivamente).

La figura 15. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A sobre células NEC8 de tipo salvaje y NEC8 con inactivación.

Se analizó la actividad de CDC de los anticuerpos anti-CLDN6 utilizando ensayo dependiente de luciferasa para detectar el ATP endógeno dentro de las células no lisadas. Por lo tanto, se trataron células NEC8 de tipo

salvaje (NEC8 LVTS2 77) que expresan ectópicamente luciferasa, con diferentes concentraciones de quimAB 61D 64A, 67A y 89A. En las células NEC-8, quimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis, mientras que las células NEC-8 con inactivación de CLDN6 (NEC8 LVTS2 54) ninguna de dichos anticuerpos indujo lisis celular no específica. Este resultado demuestra las funciones efectoras específicas de diana de quimAB 61D, 64A, 67A y 89A.

La figura 16. Actividad de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A sobre células NEC8 de tipo salvaje y NEC8 con inactivación.

La actividad de ADCC de los anticuerpos anti-CLDN6 se analizó utilizando un ensayo dependiente de luciferasa para detectar el ATP endógeno dentro de células no lisadas. Por lo tanto, se trataron células NEC-8 de tipo salvaje (NEC8 LVTS2 77) con diferentes concentraciones de quimAB 61D, 64A, 67A y 89A. QuimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron actividad de ADCC dependiente de la dosis e indujeron la ADCC incluso a concentraciones bajas de anticuerpos. Para demostrar la especificidad de diana, se utilizaron células NEC8 con una inactivación estable de CLDN6 (NEC8 LVTS2 54).

La figura 17. Efecto a largo plazo terapéutico de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 64A y 67A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo utilizó xenoinjertos de NEC8 de expresión endógena de CLDN6 en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Los ratones se trataron durante 46 días con anticuerpos específicos de CLDN6. Tras el tratamiento, se monitorizó el crecimiento tumoral durante 60 días. Incluso tras detener la inmunoterapia los ratones tratados con anticuerpos monoclonales murinos muMAB 61D, 64A y 67A no mostraron ningún crecimiento tumoral.

La figura 18. Efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo utilizó xenoinjertos de NEC8 que expresan endógenamente CLDN6 en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Los diagramas de dispersión representan volúmenes de tumores injertados en diferentes puntos temporales durante el tratamiento precoz de xenoinjertos de NEC8 en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. En comparación con el grupo de control salino, muMAB 89A mostró inhibición del crecimiento tumoral en ratones injertados con células NEC8 (A). Los ratones fueron tratados durante 47 días con PBS como control y el anticuerpo específico de CLDN6, respectivamente. Se monitorizó el crecimiento tumoral durante 51 días adicionales. En comparación con el control de PBS, no se detectaron tumores en ratones tratados con muMAB89A al final del estudio (B).

La figura 19. Efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A en un modelo de xenoinjeto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

Los diagramas de dispersión representan volúmenes de tumores injertados en diferentes puntos temporales durante el tratamiento de xenoinjertos de NEC8 avanzados en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. La inmunoterapia con el anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A mostró una inhibición del crecimiento tumoral de los xenoinjertos de NEC8 sólidos en comparación con los grupos tanto de anticuerpos como de control salino.

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

Quince días después de la injertación los ratones se trataron durante 45 días con el anticuerpo específico para CLDN6 muMAB 64A. Se monitorizó el crecimiento tumoral durante 49 días adicionales (A). El gráfico de supervivencia mostró una prolongación de la supervivencia de los ratones tratados con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 64A (B).

La figura 21. Efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

Los diagramas de dispersión representan los volúmenes de tumores NEC8 injertados en diferentes puntos temporales durante el tratamiento de xenoinjertos de NEC8 avanzados. En comparación con los grupos de solución salina y de control de anticuerpos, se consiguió la inhibición del crecimiento tumoral con los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A.

La figura 22. Efecto a largo plazo terapéutico de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB

61D, 67A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

Diecisiete días después de la injertación se trataron los ratones durante 42 días con los anticuerpos específicos de CLDN6 muMAB 61D, 67A y 89A. Se monitorizó el crecimiento tumoral durante 49 días adicionales (A). El gráfico de supervivencia mostró una prolongación de la supervivencia de los ratones tratados con los anticuerpos específicos de CLDN6 muMAB 61D y 67A (B).

La figura 23. Efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales murinos anti-CLDN6 muMAB 64A y 89A en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con células NEC8 de tipo salvaje y células NEC8 con una inactivación estable de CLDN6.

MuMAB 64A y 89A mostraban únicamente un efecto terapéutico en ratones injertados con NEC8 de tipo salvaje pero no en ratones injertados con células NEC8 con inactivación de CLDN6, demostrando especificidad de diana de los anticuerpos *in vivo*.

La figura 24. Mapeado de epítopos de alta resolución de quimAB 61D, 64A, 67A y 89A.

Los mutantes de alanina se denominan "número de residuo de tipo salvaje alanina" o "número de residuo de tipo salvaje glicina" en el caso de alanina de tipo salvaje, en donde los aminoácidos se proporcionan en el código de una letra. Los aminoácidos F35, G37, S39 y posiblemente T33 del primer dominio extracelular de CLDN6 son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A. El residuo I40 resulta esencial para la unión de quimAB 89A y contribuye a la unión de quimAB 61D y 67A. Además, L151 del segundo dominio extracelular de CLDN6 contribuye a la interacción con quimAB 67A. Aunque los experimentos de inmunofluorescencia confirmaron la expresión de los mutantes de CLDN6 P28A, W30A, G49A, L50A, W51A, C54A y C64A, no mostraron tinción de la membrana. Por ello, los presentes inventores no pueden excluir que los anticuerpos de la presente invención interactuasen con dichos aminoácidos. Conjuntamente, el epítopo tal como se identifica en la presente memoria es consistente con la estrategia de inmunización de los presentes inventores con ADN y péptidos del dominio EC1 de CLDN6.

La figura 25. Alineación de secuencias de aminoácidos de región variable de cadena pesada de anticuerpos específicos de CLDN6 de la enseñanza.
Las secuencias de CDR (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) se señalan mediante un recuadro.

La figura 26. Alineación de secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera de anticuerpos específicos de CLDN6 de la enseñanza.

Las secuencias de CDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) se señalan mediante un recuadro.

La figura 27. Especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS.

La especificidad de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 se analizó mediante citometría de flujo utilizando células HEK293T transfectadas transitoriamente con CLDN6, 3, 4 y 9 humanos. Para discriminar entre las poblaciones celulares transfectadas y no transfectadas, las células se cotransfectaron con un marcador de fluorescencia como informador. La concentración de anticuerpo utilizada era la concentración que saturaba la unión (100 µg/ml). La expresión de CLDN3, 4, 6 y 9 humanas se confirmó con los anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente contra la claudina-3 humana (R&D Systems, MAB4620) y la claudina-4 humana (R&D Systems, MAB4219) y el anticuerpo monoclonal murino reactivo con CLDN6/9 muMAB 5F2D2, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales quiméricos quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron unión a CLDN6 sin interactuar con CLDN3, 4 y 9, respectivamente.

La figura 28. Afinidades de unión relativas de los anticuerpos monoclonaels quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS a células HEK293-CLDN6.

Con el fin de determinar las afinidades relativas, se analizó mediante citometría de flujo la unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a CLDN6 humano expresado establemente sobre la superficie de células HEK293. En el experimento de saturación de la unión, se representó gráficamente la concentración de los anticuerpos frente a las señales de FACS (mediana de intensidad de fluorescencia). Se calculó la EC50 (concentración de anticuerpo que se une a la mitad de los sitios de unión en el equilibrio) mediante regresión no lineal. Los anticuerpos específicos de CLDN6 mostraron valores de EC50 bajos similares y se alcanzó la saturación de unión a concentraciones bajas.

La figura 29. Afinidades de unión relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS a las células NEC8.

Con el fin de determinar las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a las células tumorales que expresan endógenamente CLDN6 humano, se analizó mediante citometría de flujo la unión a la línea celular de cáncer testicular NEC8. En comparación con los anticuerpos específicos de CLDN6 quimAB 64A, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS, la variante de combinación de cadena ligera mAb206-LCC mostró una afinidad de unión tres veces más fuerte a las células NEC8. En todos los casos se alcanzó la saturación de la unión a concentraciones bajas.

La figura 30. Afinidades de unión relativas de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS a las células OV90.

Se analizaron mediante citometría de flujo las afinidades de unión de los anticuerpos anti-CLDN6 a la línea celular de cáncer ovárico humano OV90. Los anticuerpos específicos de CLDN6 mostraron valores de EC50 bajos similares. La variante de combinación de cadena ligera mAb206-LCC mostró la unión más fuerte a las células OV90.

La figura 31a. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG en células NEC8 de tipo salvaje y NEC8 con inactivación génica.

Se analizó la actividad de CDC de los anticuerpos anti-CLDN6 utilizando un ensayo dependiente de luciferasa para detectar el ATP endógeno dentro de las células no lisadas. Por lo tanto, se trataron las células de tipo salvaje NEC8 que expresaban ectópicamente luciferasa, con diferentes concentraciones de quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG. En las células NEC8, los anticuerpos mostraron una actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis, mientras que en células NEC8 con inactivación de CLDN6, ninguno de dichos anticuerpos indujo una lisis celular no específica. Este resultado demuestra las funciones efectoras específicas de diana de quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG.

La figura 31b. Actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS en células NEC8.

Los anticuerpos mostraron actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis. En comparación con quimAB 64A, las variantes por sustitución de aminoácido mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron actividades de CDC similares en células NEC8.

La figura 32a. Actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS en células NEC8 y OV90.

La actividad de ADCC de los anticuerpos anti-CLDN6 se analizó utilizando un ensayo dependiente de luciferasa para detectar el ATP endógeno dentro de células no lisadas. Por lo tanto, se trataron células NEC8 y OV90 con diferentes concentraciones de anticuerpos quiméricos contra CLDN6. Todos los anticuerpos mostraron actividad de ADCC dependiente de la dosis e indujeron ADCC incluso a concentraciones de anticuerpo bajas en ambas líneas celulares tumorales.

La figura 32b. Actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG en células NEC8 de tipo salvaje y NEC8 con inactivación.

Con el fin de mostrar la especificidad de diana se utilizaron células NEC8 con una inactivación estable de CLDN6.

La figura 33. Efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

El modelo utilizó xenoinjertos de NEC8 en ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Diecisiete días después de la injertación se trataron los ratones con los anticuerpos específicos de CLDN6 mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS y se monitorizó el crecimiento tumoral. Los diagramas de dispersión representan los volúmenes de los tumores injertados en diferentes puntos temporales durante un tratamiento avanzado de xenoinjertos de NEC8 en ratones. En comparación con el grupo de control de anticuerpo, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron inhibición del crecimiento tumoral.

La figura 34. Efecto terapéutico de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

En comparación con la figura 33, las curvas de crecimiento muestran en mayor detalle que los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 fueron capaces de inhibir el crecimiento tumoral (A). El gráfico de supervivencia muestra la prolongación de la supervivencia de los ratones tratados con anticuerpos específicos de CLDN6 (B).

La figura 35. Mapeado de epítopos de alta resolución de quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS.

Los mutantes de alanina se denominan "número de residuo de tipo salvaje alanina", en donde los aminoácidos se proporcionan en el código de una letra. Los aminoácidos F35, G37 y S39 y potencialmente T33 del primer dominio extracelular de CLDN6 son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6. QuimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron patrones de unión idénticos.

La figura 36. Efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A en un modelo de xenoinjerto de metástasis con ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8.

En el modelo de metástasis se inyectaron células NEC8 en la vena de la cola de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Tres días después de la injertación los ratones fueron tratados con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 64A. Tras 8 semanas se prepararon los pulmones y se analizó la carga tumoral mediante PCR. En comparación con el grupo de control de PBS, el anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A mostró claramente la inhibición del crecimiento tumoral.

La figura 37. Tinción inmunohistoquímica de tejidos de cáncer y normales humanos utilizando los anticuerpos monoclonales muMAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG.

En contraste con los tejidos normales, se observó una tinción fuerte y homogénea en secciones de tejido procedentes de cánceres de ovario y de testículo. Se detectó una tinción membranal muy fuerte de las poblaciones de células epiteliales malignas, mientras que las células contiguas estromales y epiteliales no malignas no se tiñeron. Estos resultados muestran claramente que los anticuerpos específicos de CLDN6 de la presente invención se unen específicamente a las células malignas derivadas de los pacientes tumorales (explicación: número de tejidos que resultaron teñidos por anticuerpo/número de tejidos analizados).

Definición de términos

Con el fin de que la presente enseñanza se entienda más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Se proporcionan definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Durante la presente memoria y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, el término "comprende" y variaciones tales como "comprendiendo" se entenderán que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referencias similares utilizadas en el contexto de la descripción de la invención enseñanza especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o lo contradiga claramente el contexto. La mención de intervalos de valores en la presente memoria meramente pretende servir como un método abreviado de referencia individual a cada valor separado comprendido dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, cada valor individual se incorpora en la memoria como se hubiera sido individualmente mencionado en la presente memoria. Todos los métodos indicados en la presente memoria pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o lo contradiga claramente el contexto. La utilización todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo "tal como"), proporcionada en la presente memoria, se proporciona a fin de ilustrar mejor la enseñanza.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, en donde establecen la barrera paracelular que controla el paso de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembranales que abarcan la membrana 4 veces con los extremos N-terminal y C-terminal situados ambos en el citoplasma. El primer bucle extracelular consiste de promedio de 53 aminoácidos, mientras que el segundo consiste de aproximadamente 24 aminoácidos. CLDN6 y CLDN9 son los elementos más similares de la familia de CLDN.

El término "CLDN" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a claudina e incluye CLDN6, CLDN9, CLDN4 y CLDN3. Preferentemente una CLDN es una CLDN humana.

El término "CLDN6" preferentemente se refiere a CLDN6 humana y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o

codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8, tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID nº 1, o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2 o que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 8. El primer bucle extracelular de CLDN6 preferentemente comprende los aminoácidos 28 a 80, más preferentemente los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 o la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 8, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 7. El segundo bucle extracelular de CLDN6 preferentemente comprende los aminoácidos 138 a 160, preferentemente los aminoácidos 141 a 159, más preferentemente los aminoácidos 145 a 157 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2 o la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 8, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 6. Dichos primer y segundo bucles extracelulares preferentemente forman la porción extracelular de CLDN6.

El término "CLDN9" preferentemente se refiere a CLDN9 humana y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 9, o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 9. El primer bucle extracelular de CLDN9 preferentemente comprende los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 9. El segundo bucle extracelular de CLDN9 preferentemente comprende los aminoácidos 141 a 159 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 9. Dicho primer y segundo bucles extracelulares preferentemente forman la porción extracelular de CLDN9.

El término "CLDN4" preferentemente se refiere a CLDN4 humano y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10, o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 10. El primer bucle extracelular de CLDN4 preferentemente comprende los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 10. El segundo bucle extracelular de CLDN4 preferentemente comprende los aminoácidos 141 a 159 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 10. Dicho primer y segundo bucles extracelulares preferentemente forman la porción extracelular de CLDN4.

El término "CLDN3" preferentemente se refiere a CLDN3 humano y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11, o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 11. El primer bucle extracelular de CLDN3 preferentemente comprende los aminoácidos 27 a 75 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 11. El segundo bucle extracelular de CLDN3 preferentemente comprende los aminoácidos 140 a 158 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 11. Dicho primer y segundo bucles extracelulares preferentemente forman la porción extracelular de CLDN3.

Las secuencias de CLDN anteriormente indicadas incluyen cualesquiera variantes de dichas secuencias, en particular mutantes, variante de procesamiento, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular los que se encuentran presentes naturalmente. Una variante alélica se refiere a una alteración de la secuencia normal de un gen, la secuencia del cual con frecuencia no está clara. La secuencia génica completa con frecuencia identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos con una especie de origen diferente de la de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos dada. El término "CLDN" comprende: (i) variantes de procesamiento de CLDN, (ii) variantes post-traduccionalmente modificadas de CLDN, particularmente incluyendo variantes con diferente glucosilación, tal como el estado de N-glucosilación, (iii) variantes de conformación de CLDN, (iv) variantes de CLDN relacionadas con cáncer y no relacionadas con cáncer. Preferentemente CLDN se encuentra presente en su conformación natural.

Se ha encontrado que CLDN6 se expresa, por ejemplo, en el cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de conductos biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria. CLDN6 es una diana particularmente preferente para la prevención y/o el tratamiento del cáncer ovárico, en particular el adenocarcinoma ovárico y el teratocarcinoma ovárico, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y el adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular el sarcoma y el carcinosarcoma sinoviales, cáncer de conductos biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer del íleo, en particular el adenocarcinoma del intestino delgado y el adenocarcinoma del íleo, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinativas tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas del testículo, y las formas metastásicas de los mismos. En una forma de realización, la enfermedad de cáncer asociada a la expresión de CLDN6 se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer ovárico metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferentemente, el

cáncer ovárico es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferentemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferentemente es cáncer bronquiolar, tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar. En una forma de realización, la célula tumoral asociada a la expresión de CLDN6 es una célula de dicho cáncer.

El término "porción" se refiere a una fracción. Con respecto a una estructura particular, tal como una secuencia de aminoácidos o proteína, el término "porción" de la misma puede referirse a una fracción continua o discontinua de dicha estructura. Preferentemente, una porción de una secuencia de aminoácidos comprende por lo menos 1%, por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, preferentemente por lo menos 40%, preferentemente por lo menos 50%, más preferentemente por lo menos 60%, más preferentemente por lo menos 70%, todavía más preferentemente por lo menos 80% y todavía más preferentemente por lo menos 90% de los aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Preferentemente, en el caso de que la porción sea una fracción discontinua, dicha fracción discontinua está compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más porciones de una estructura, siendo cada porción un elemento continuo de la estructura. Por ejemplo, una fracción discontinua de una secuencia de aminoácidos puede estar compuesta de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más, preferentemente no más de 4 porciones de dicha secuencia de aminoácidos, en la que cada porción preferentemente comprende por lo menos 5 aminoácidos continuos, por lo menos 10 aminoácidos continuos, preferentemente por lo menos 20 aminoácidos continuos, preferentemente por lo menos 30 aminoácidos continuos de la secuencia de aminoácidos.

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

La expresión "una porción extracelular de un CLDN" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una parte de un CLDN encarada hacia el espacio extracelular de una célula y que preferentemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo por anticuerpos localizados en el exterior de la célula. Preferentemente, la expresión se refiere a uno o más bucles extracelulares o a una parte de los mismos o a cualquier otra parte extracelular de un CLDN que preferentemente es específica para dicho CLDN. Preferentemente, dicha parte comprende por lo menos 5, por lo menos 8, por lo menos 10, por lo menos 15, por lo menos 20, por lo menos 30 o por lo menos 50 aminoácidos o más.

La expresión "CLDN asociado a la superficie de una célula" debe entenderse que se refiere a CLDN nativo, es decir, CLDN en su estado no desnaturalizado, preferentemente plegado naturalmente. Preferentemente, la expresión "CLDN asociado a la superficie de una célula" se refiere a que CLDN está asociado o se localiza en la membrana plasmática de dicha célula, en la que por lo menos una parte de CLDN, preferentemente la porción extracelular, se encara hacia el espacio extracelular de dicha célula y es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo por los anticuerpos localizados en el exterior de la célula. La asociación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, la asociación puede ser con uno o más dominios transmembranales, uno o más anclajes lipídicos y/o mediante la interacción con cualquier otra proteína, lípido, sacárido u otra estructura que puede encontrarse en la cara externa de la membrana plasmática de la célula. Por ejemplo, un CLDN asociado a la superficie de la célula puede ser una proteína transmembranal, es decir, una proteína integral de membrana, que presenta una porción extracelular o puede ser una proteína asociada a la superficie de una célula mediante la interacción con otra proteína que es una proteína transmembranal.

CLDN6 se asocia a la superficie de una célula en el caso de que se encuentre localizada en la superficie de dicha célula y sea accesible a la unión por anticuerpos específicos para CLDN6 añadidos a la célula. En formas de realización preferentes, una célula que se caracteriza por la asociación de CLDN6 a la superficie celular de la misma es una célula que expresa CLDN6. Debe entenderse que, en el caso de que las células expresen CLDN6, el CLDN6 asociado a la superficie de dichas células puede ser únicamente una porción del CLDN6 expresado.

La expresión "una célula portadora de un CLDN" preferentemente se refiere a que dicha célula porta un CLDN sobre su superficie, es decir, que el CLDN se encuentra asociado a la superficie de dicha célula.

La expresión "superficie celular" o "superficie de una célula" se utiliza de acuerdo con su significado normal en la técnica y, de esta manera, incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión de otras proteínas y otras moléculas.

La expresión "CLDN expresado sobre la superficie de una célula" se refiere a que el CLDN expresado por una célula se observa en asociación con la superficie de dicha célula.

Según la enseñanza, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula y no se encuentra sustancialmente asociado a la superficie celular en el caso de que el nivel de expresión y asociación sea menor que la expresión y asociación en células placentarias o tejido placentario. Preferentemente, el nivel de expresión y asociación es

inferior a 10%, preferentemente inferior a 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o 0,05% de la expresión y asociación en células placentarias o tejido placentario o incluso inferior. Preferentemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula y no se encuentra sustancialmente asociado a una superficie celular en el caso de que el nivel de expresión y asociación exceda el nivel de expresión y asociación en tejido no canceroso no tumorigénico diferente del tejido placentario en no más de 2 veces, preferentemente 1,5 veces, y preferentemente no exceda el nivel de expresión y asociación en dicho tejido no canceroso no tumorigénico. Preferentemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula no se encuentra sustancialmente asociado a la superficie celular en el caso de que el nivel de expresión o asociación sea inferior al límite de detección y/o en el caso de que el nivel de expresión o asociación sea excesivamente bajo para permitir la unión de anticuerpos específicos de CLDN6 añadidos a las células.

Según la enseñanza, CLDN6 se expresa en la célula y se encuentra asociado a la superficie celular en el caso de que el nivel de expresión y asociación exceda el nivel de expresión y asociación en tejido no canceroso no tumorigénico diferente del tejido placentario, preferentemente en más de 2 veces, preferentemente 10 veces, 100 veces, 1.000 veces o 10.000 veces. Preferentemente, CLDN6 se expresa en la célula y se encuentra asociado a la superficie celular en el caso de que el nivel de expresión y asociación sea superior al límite de detección y/o en el caso de que el nivel de expresión y asociación sea suficientemente elevado para permitir la unión de anticuerpos específicos de CLDN6 añadidos a las células. Preferentemente CLDN6 expresado en la célula se expresa o resulta expuesto sobre la superficie de dicha célula.

El término "balsa" se refiere a los microdominios membranales ricos en esfingolípidos y en colesterol situados en el área de cara externa de la membrana plasmática de la célula. La capacidad de determinadas proteínas de asociarse dentro de dichos dominios y su capacidad de formar "agregados" o "agregados focales" puede afectar a la función de la proteína. Por ejemplo, la traslocación de moléculas de CLDN6 hacia el interior de dichas estructuras, tras ser ligados por anticuerpos de la presente enseñanza, crea una alta densidad de complejos de antígeno CLDN6-anticuerpo en las membranas plasmáticas. Esta elevada densidad de complejos de antígeno CLDN6-anticuerpo puede permitir la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

Según la enseñanza, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo el cáncer, en particular aquellas formas de cáncer indicadas en la presente memoria.

La expresión "enfermedades que implican células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular" se refiere según la enseñanza a la expresión y asociación en las células de un tejido u órgano enfermo se encuentran preferentemente incrementadas en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un incremento se refiere a un incremento de por lo menos 10%, en particular de por lo menos 20%, por lo menos 50%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 500%, por lo menos 1.000%, por lo menos 10.000% o incluso más. En una forma de realización, la expresión y asociación con la superficie celular únicamente se observa en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se encuentra reprimida. Según la enseñanza, entre las enfermedades asociadas a las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas se incluyen enfermedades tumorales tales como las enfermedades de cáncer. Además, según la enseñanza, las enfermedades tumorales tales como las enfermedades de cáncer preferentemente son aquellas en las que las células tumorales o las células de cáncer expresan CLDN6 y se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "enfermedad tumoral", una "enfermedad de tipo tumoral" o una "enfermedad tumorigénica" se refiere a una enfermedad caracterizada por una multiplicación, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celulares reguladas de manera aberrante, lo que puede resultar en la producción, o en la tendencia a producir, tumores y/o metástasis tumorales. La expresión "célula tumoral" se refiere a una célula anormal que se multiplica mediante una proliferación celular no controlada rápida y que continúa multiplicándose después de cesar los estímulos que iniciaron la nueva multiplicación.

El término "tumor" se refiere a un grupo anormal de células o a un tejido que crece mediante una proliferación celular no controlada rápida y que continúa creciendo tras cesar los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y habitualmente forman una masa diferenciada de tejido, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

Preferentemente, una "enfermedad tumoral", "enfermedad de tipo tumoral" o "enfermedad tumorigénica" según la enseñanza es una enfermedad de cáncer, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula de cáncer. Preferentemente una "enfermedad tumoral", "enfermedad de tipo tumoral" o "enfermedad tumorigénica" se caracteriza por células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con la superficie celular de las mismas y una célula tumoral expresa CLDN6 y se caracteriza por la asociación de CLDN6 con la superficie celular.

Una célula que expresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 con la superficie celular preferentemente es una célula tumoral o una célula de cáncer, preferentemente de los tumores y cánceres indicados en la presente memoria. Preferentemente, dicha célula es una célula diferente de una célula placentaria.

Las enfermedades de cáncer preferentes o cánceres según la enseñanza se seleccionan de entre el grupo que consiste de cáncer ovárico, en particular adenocarcinoma ovárico y teratocarcinoma ovárico, cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en particular el carcinoma y el adenocarcinoma pulmonares de células escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular el adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular el sarcoma y el carcinosarcoma sinoviales, cáncer de conductos biliares, cáncer de la vejiga urinaria, en particular el carcinoma de células transicionales y el carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular el carcinoma de células renales, incluyendo el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluyendo el cáncer del íleo, en particular el adenocarcinoma del intestino delgado y el adenocarcinoma del íleo, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular el seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, un tumor de células germinativas tal como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular un tumor de células germinativas del testículo, y las formas metastásicas de los mismos.

Los tipos principales de cáncer de pulmón son el carcinoma de pulmón microcítico (SCLC) y el carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC). Existen tres subtipos principales de carcinoma de pulmón de células no pequeñas: el carcinoma de pulmón de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de pulmón de células grandes. Los adenocarcinomas constituyen aproximadamente el 10% de los cánceres de pulmón. Este cáncer habitualmente se observa periféricamente en los pulmones, al contrario cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y el cáncer de pulmón escamoso, los cuales tienden a localizarse más centralmente.

El cáncer de piel es un crecimiento maligno sobre la piel. Los cánceres de piel más comunes son el cáncer de células basales, el cáncer de células escamosas y el melanoma. El melanoma maligno es un tipo grave de cáncer de piel. Se debe a la multiplicación descontrolada de las células pigmentarias denominadas melanocitos.

Según la enseñanza, un "carcinoma" es un cáncer que se inicia en la capa de revestimiento (células epiteliales) de los órganos.

El "carcinoma bronquiolar" es un carcinoma del pulmón que se cree que deriva del epitelio de los bronquiolos terminales, en los que el tejido neoplásico se extiende a lo largo de las paredes alveolares y crece en pequeñas masas dentro de los alveolos. Puede observarse mucina en algunas de las células y en el material en los alveolos, que también incluye células denudadas.

El "adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en tejido glandular. Este tejido también es parte de una categoría más grande de tejidos conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye piel, glándulas y una diversidad de otros tejidos que revisten las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente del ectodermo, endodermo y mesodermo. Para clasificarse como adenocarcinoma, las células no necesitan ser necesariamente una parte de una glándula, con la condición de que presenten propiedades secretorias. Esta forma de carcinoma puede producirse en algunos mamíferos superiores, incluyendo el ser humano. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que se derivan, mientras los pobremente diferenciados pueden no parecerse. Mediante la tinción de las células de una biopsia el patólogo podrá determinar si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden aparecer en muchos tejidos del cuerpo, debido a la naturaleza ubicua de las glándulas en el cuerpo. Aunque cada glándula puede no secretar la misma sustancia, con la condición de que la célula presente una función exocrina, se considera glandular y su forma maligna se denomina, por lo tanto, adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y con frecuencia metastatizan en caso de disponer de suficiente tiempo para ello. El adenocarcinoma ovárico es el tipo más común de carcinoma ovárico. Incluye los adenocarcinomas seroso y mucinoso, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometrioide.

El "cistadenocarcinoma" es una forma maligna de un tumor epitelial-estromal superficial, un tipo de cáncer ovárico.

Los tumores epiteliales-estromales superficiales son una clase de neoplasmas ováricos que se cree que se derivan del epitelio superficial ovárico (peritoneo modificado) o de tejido endometrial ectópico o de conducto de Falopio (tubal). Este grupo de tumores representa la mayoría de los tumores ováricos.

El teratocarcinoma se refiere a un tumor de células germinativas que es una mezcla de teratoma y carcinoma embrionario, o coriocarcinoma, o ambos. El coriocarcinoma es un cáncer maligno, trofoblástico y agresivo, habitualmente de la placenta. Se caracteriza por una extensión hematógena precoz a los pulmones.

Un sarcoma es un cáncer del tejido conectivo (hueso, cartílago, adiposo) que resulta en la proliferación del mesodermo. Lo anterior contrasta con los carcinomas, que son de origen epitelial. El sarcoma sinovial es una forma rara de cáncer que habitualmente se produce en zonas próximas a las articulaciones de los brazos o piernas. Es uno de los sarcomas de los tejidos blandos.

El carcinoma de células renales también conocido como cáncer de células renales o adenocarcinoma de células renales es un cáncer del riñón que se origina en el revestimiento del túbulo contorneado proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y eliminan los productos de desecho. El carcinoma de células renales es claramente el tipo más común de cáncer de riñón en el adulto y el más letal de los tumores genitourinarios. Son subtipos diferenciados de carcinoma de células renales el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar. El carcinoma de células renales de células claras es la forma más común de carcinoma de células renales. Bajo el microscopio se observa que las células que constituyen el carcinoma de células renales de células claras presentan una apariencia muy pálido o clara. El carcinoma de células renales papilar es el segundo subtipo más común. Estos cánceres forman proyecciones pequeñas en forma de dedo (denominadas papilas) en algunos, si no en la mayoría, de los tumores.

El tumor de células germinativas es un neoplasma derivado de las células germinativas. Los tumores de células germinativas pueden ser tumores cancerosos o no cancerosos. Las células germinativas normalmente se observan en el interior de las gónadas (ovarios y testículos). Los tumores de células germinativas que se originan fuera de las gónadas (por ejemplo en la cabeza, dentro de la boca, cuello o pelvis; en fetos, bebés y niños pequeños con frecuencia se observan en la línea media del cuerpo, en particular en la punta del coxis) pueden ser anomalías congénitas que resultan de errores durante el desarrollo del embrión.

Las dos clases principales de tumores de las células germinativas son los seminomas y no seminomas, en las que entre los no seminomas se incluyen: teratocarcinoma, carcinoma embrionario, tumores del saco vitelino, coriocarcinoma y teratoma diferenciado. La mayoría de líneas celulares de los no seminomas son equivalentes a carcinomas embrionario, es decir, están compuestos prácticamente por completo de células madre que no se diferencian bajo condiciones basales, aunque algunos pueden responder a inductores de la diferenciación tales como el ácido retinoico.

El término "metástasis" se refiere a la extensión de las células de cáncer desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración en las membranas basales del endotelio para entrar en la cavidad corporal y los vasos, y posteriormente, tras ser transportado por la sangre, la infiltración en los órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral con frecuencia se produce incluso tras la eliminación del tumor primario debido a que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una forma de realización, el término "metástasis" según la enseñanza se refiere a "metástasis distante", que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y el sistema regional de nódulos linfáticos.

Las células de un tumor secundario o metastásico son similares a las presentes en el tumor original. Ello significa que, por ejemplo, si el cáncer ovárico se metastatiza en el hígado, el tumor secundario está constituido de células ováricas anormales, no de células hepáticas anormales. El tumor en el hígado en este caso se denomina cáncer ovárico metastásico, no cáncer de hígado.

El término "tratar" se refiere a la administración de un compuesto o composición tal como se indica en la presente memoria en un sujeto con el fin de evitar o eliminar una enfermedad, incluyendo reducir el tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto; la detención o enlentecimiento de una enfermedad en un sujeto, la inhibición o enlentecimiento del desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto, la reducción de la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o de las recurrencias en un sujeto que presenta actualmente o que previamente ha presentado la enfermedad, y/o la prolongación, es decir el incremento, de la duración de vida del sujeto.

La expresión "tratamiento de una enfermedad" incluye la curación, acortamiento de la duración, mejora, prevención, enlentecimiento o inhibición de la progresión o agravamiento, o la prevención o retardo de la aparición de una enfermedad o de los síntomas de la misma.

La expresión "en riesgo" se refiere a un sujeto, es decir, un paciente, en el que se ha identificado una probabilidad superior a la normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha presentado, o que actualmente presenta, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que presenta un riesgo incrementado de desarrollar una enfermedad, ya que dicho sujeto puede todavía desarrollar una enfermedad. Los sujetos que actualmente presentan, o que han presentado, un cáncer, también presentan un riesgo incrementado de metástasis del cáncer.

El término "inmunoterapia" se refiere a un tratamiento que implica una reacción inmunológica específica. En el contexto de la presente enseñanza, algunos términos tales como "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se refieren a la prevención o el tratamiento o ambos de la aparición y/o la propagación de un tumor en un individuo. El término "inmunoterapia" en el contexto de la presente enseñanza preferentemente se refiere a la inmunización tumoral o vacunación tumoral activas. Una administración profiláctica de una inmunoterapia, por ejemplo una administración profiláctica de la composición de la enseñanza, preferentemente protege al receptor frente al desarrollo de crecimientos tumorales. Una administración terapéutica de una inmunoterapia, por ejemplo

la administración terapéutica de la composición de la enseñanza, puede conducir a la inhibición del avance/crecimiento del tumor. Lo anterior comprende la desaceleración del avance/crecimiento del tumor, en particular la interrupción del avance del tumor, lo que preferentemente conduce a la eliminación del tumor. Una administración terapéutica de una inmunoterapia puede proteger al individuo, por ejemplo, frente a la diseminación o la metástasis de tumores existentes.

El término "inmunización" o "vacunación" se refiere al procedimiento de administración de antígeno en un sujeto con el propósito de inducir una respuesta inmunológica por motivos terapéuticos o profilácticos.

Los términos "sujeto", "individuo", "organismo" o "paciente" se utilizan intercambiablemente y se refieren a vertebrados, preferentemente mamíferos. Por ejemplo, los mamíferos en el contexto de la presente enseñanza son seres humanos, primates no humanos, animales domesticados tales como perros, gatos, ovejas, vacas, cabras, cerdos, caballos, etc., animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas, etc., así como animales en cautividad, tales como animales de zoológicos. El término "animal" tal como se utiliza en la presente memoria incluye además los seres humanos. El término "sujeto" puede incluir además un paciente, es decir un animal, preferentemente un ser humano que presenta una enfermedad, preferentemente una enfermedad asociada a la expresión de CLDN6, preferentemente una enfermedad tumorigénica tal como un cáncer.

El término "adyuvante" se refiere a compuestos que prolongan o incrementan o aceleran una respuesta inmunológica. La composición de la presente enseñanza preferentemente ejerce su efecto sin adición de adyuvantes. Sin embargo, la composición de la presente solicitud puede contener cualquier adyuvante conocido. Los adyuvantes comprenden un grupo heterogéneo de compuestos, tales como emulsiones de aceites (por ejemplo adyuvantes de Freund), compuestos minerales (tales como alúmina), productos bacterianos (tales como toxina de *Bordetella pertussis*), liposomas y complejos inmunoestimuladores. Son ejemplos de adyuvantes, monofosforil-lípido A (MPL, SmithKline Beecham), saponinas tales como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham, documento nº WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So *et al.*, Mol. Cells 7:178-186, 1997), adyuvantes de Freund incompletos, adyuvantes de Freund completos, vitamina E, montanide, alúmina, oligonucleótidos CpG (Krieg *et al.*, Nature 374:546-549, 1995) y diversas emulsiones de agua en aceite que se preparan a partir de aceites biológicamente degradables, tales como escualeno y/o tocoferol.

Según la enseñanza, una muestra puede ser cualquier muestra útil según la presente enseñanza, en particular una muestra biológica, tal como una muestra de tejido, incluyendo líquidos corporales y/o una muestra celular, y puede obtenerse de la manera convencional, tal como mediante biopsia de un tejido, incluyendo la biopsia por punción y extrayendo sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros líquidos corporales. Según la enseñanza, la expresión "muestra biológica" incluye además fracciones de muestras biológicas.

El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, e incluye cualquier molécula que comprenda una porción de unión a antígeno de la misma. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales y fragmentos o derivados de los mismos, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo scFv y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno tales como los fragmentos Fab y Fab' e incluye además todas las formas recombinantes de los anticuerpos, por ejemplo anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glucosilados y cualesquiera fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y derivados tal como se indican en la presente memoria. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria, VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria, VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden dividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), con regiones intercaladas que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunológico (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Según la enseñanza, la expresión "por lo menos una de las secuencias de CDR" preferentemente se refiere a por lo menos la secuencia de CDR3. La expresión "secuencias de CDR de una cadena de anticuerpo" preferentemente se refiere a CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo.

Según la enseñanza, una referencia a una cadena de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR particular, tal como una secuencia de CDR3 particular, se refiere a que dicha secuencia de CDR particular forma la región CDR, tal como la región CDR3 de dicha cadena de anticuerpo, es decir, la región CDR consiste de dicha secuencia de CDR particular, o forma parte de la región CDR, tal como la región CDR3 de dicha cadena de anticuerpo, es decir, la región CDR comprende dicha secuencia de CDR particular.

En el caso de que según la enseñanza se hace referencia a un anticuerpo que comprende una cadena pesada de anticuerpo particular y/o una cadena ligera de anticuerpo particular, tal como una cadena que comprende secuencias de CDR particulares, resulta preferente que las cadenas pesadas y/o cadenas ligeras del anticuerpo estén compuestas, cada una, de la cadena pesada de anticuerpo particular y/o la cadena ligera de anticuerpo particular.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que presenta un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con los dominios constantes o únicamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en las regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificarse con una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo modificarse para ser similares a las inmunoglobulinas humanas de modo más estrecho. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas presentan una o más CDR que se encuentran alteradas con respecto al anticuerpo original.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga respecto a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo respecto a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de tanto las cadenas ligeras como las pesadas mimetiza las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las partes constantes son homólogas respecto a secuencias de anticuerpos derivadas de otro. Una ventaja clara de dichas formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable presenta la ventaja de ser fácil de preparar y de que la especificidad no resulta afectada por cuál es su origen al ser humana la región constante, es menos probable que induzca una respuesta inmunológica de un sujeto humano al inyectar los anticuerpos que al inyectar una región constante de un origen no humano. Sin embargo, la definición no se encuentra limitada al presente ejemplo particular.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de unión"), tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo se 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 mediante un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmentos Fd que consisten de los dominios VH y CH, (iv) fragmentos Fav que consisten de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consisten de un dominio VH, (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas, y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados en genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, con un conector sintético que permite que formen una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que se encuentren comprendidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina que comprenden: (i) un polipéptido dominio de unión que se fusiona con un polipéptido región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región contante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, e (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. El polipéptido dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina se dan a conocer adicionalmente en los documentos nº US 2003/0118592 y nº US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, y los fragmentos se criban para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que resulta reconocida por el sistema inmunológico, por ejemplo que resulta reconocida por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítopos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno que resultan reconocidos por el sistema inmunológico. En el contexto de la presente enseñanza, el epítopo preferentemente se derivad e una proteína CLDN. Los epítopos habitualmente consisten en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales sacáridas y habitualmente presentan características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los segundos se

pierde en presencia de solventes desnaturalizantes. Un epítopo de una proteína tal como un CLDN preferentemente comprende una parte continua o discontinua de dicha proteína y preferentemente presenta una longitud de entre 5 y 100, preferentemente de entre 5 y 50, más preferentemente de entre 8 y 30, todavía más preferentemente de entre 10 y 25 aminoácidos, por ejemplo el epítopo preferentemente puede presentar una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.

La expresión "epítopo discontinuo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un epítopo conformacional en un antígeno de proteína que está formado de por lo menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

La expresión "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que presenta 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 sobre la superficie de una célula efectora. La expresión "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido, o complejo de proteínas o péptidos, que presenta 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 sobre la superficie de una célula efectora, y (c) por lo menos otro componente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la enseñanza incluye, aunque sin limitarse a ellas, moléculas biespecíficas, triespecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas con diana en CLDN6, y otras dianas tales como receptores de Fc sobre células efectoras. La expresión "anticuerpos biespecíficos" incluye además los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptido, aunque utilizan un conector que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; Poljak R.J. *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión a antígeno unidas entre sí, por lo menos dos de las cuales presentan especificidades diferentes. Entre estas diferentes especificidades se incluyen una especificidad de unión para un receptor de Fc sobre una célula efectora y una especificidad de unión para un antígeno o epítopo sobre una célula diana, por ejemplo una célula tumoral.

Los anticuerpos indicados en la presente memoria pueden ser anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Entre los anticuerpos humanos de la enseñanza pueden incluirse residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*).

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítopo particular. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo el ratón, fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como: (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatorial recombinante de anticuerpos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que impliquen el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye células huésped eucarióticas recombinantes que expresan un anticuerpo, tal como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación a un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Dicha expresión se refiere a un anticuerpo que presenta una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante que corresponde a la observada en un organismo que no consiste en el organismo transgénico y que se deriva generalmente de una especie diferente del organismo transgénico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que presenta

cadenas ligeras y pesadas procedentes de organismos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo que presenta una cadena pesada humana asociada a una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

La enseñanza incluye todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos indicados en la presente memoria que para los fines de la enseñanza se encuentran comprendidos en el término "anticuerpo". La expresión "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos indicados en la presente memoria preferentemente están aislados. Un "anticuerpo aislado" tal como se utiliza en la presente memoria pretende referirse a un anticuerpo que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN6 se encuentra sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de CLDN6). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítopo, isoforma o variante de CLDN6 humano puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (por ejemplo homólogos específicos de CLDN6). Además, un anticuerpo aislado puede encontrarse sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o compuestos químicos. En una forma de realización de la enseñanza, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que presentan diferentes especificidades y que se combinan en una composición bien definida.

Según la presente enseñanza, un anticuerpo es capaz de unirse a una diana predeterminada si presenta una afinidad significativa para dicha diana predeterminada y se une a dicha diana predeterminada en ensayos estándares tales como los ensayos indicados en la presente memoria. Preferentemente, un anticuerpo es capaz de unirse a una diana en el caso de que se una detectablemente a dicha diana en un análisis de citometría de flujo (análisis de FACS), en el que se determina la unión de dicho anticuerpo a dicha diana expresada sobre la superficie de células intactas. Preferentemente, el anticuerpo se une detectablemente a dicha diana en el caso de encontrarse presente a una concentración de 10 µg/ml o inferior, 5 µg/ml o inferior o 2 µg/ml o inferior. Preferentemente, el anticuerpo se une detectablemente a dicha diana en caso de encontrarse presente a una concentración de 50 nM o inferior, 30 nM o inferior o 15 nM o inferior. La "afinidad" o la "afinidad de unión" con frecuencia se mide mediante la constante de disociación en el equilibrio (K_D). Preferentemente, la expresión "afinidad significativa" se refiere a la unión a una diana predeterminada con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior o 10^{-12} M o inferior. Los anticuerpos de la presente enseñanza preferentemente presentan valores de EC50 para la unión a CLDN6 de 6.500 ng/ml o inferiores, de 3.000 ng/ml o inferiores, de 2.500 ng/ml o inferiores, de 2.000 ng/ml o inferiores, de 1.500 ng/ml o inferiores, de 1.000 ng/ml o inferiores, de 500 ng/ml o inferiores, de 400 ng/ml o inferiores, de 300 ng/ml o inferiores, de 200 ng/ml o inferiores o de 100 ng/ml o inferiores.

Un anticuerpo no es capaz (sustancialmente) de unirse a una diana en el caso de que no presente afinidad significativa para dicha diana y no se una significativamente a dicha diana en ensayos estándares. Preferentemente un anticuerpo no es capaz (sustancialmente) de unirse a una diana en el caso de que no se una detectablemente a dicha diana en un análisis de citometría de flujo (análisis FACS), en el que se determina la unión de dicho anticuerpo a dicha diana expresada sobre la superficie de las células intactas. Preferentemente, el anticuerpo no se une detectablemente a dicha diana en caso de hallarse presenta a una concentración de hasta 2 µg/ml, preferentemente de hasta 5 µg/ml, preferentemente de hasta 10 µg/ml, preferentemente de hasta 20 µg/ml, más preferentemente de hasta 50 µg/ml, en particular de hasta 100 µg/ml, o de hasta 150 µg/ml, de hasta 200 µg/ml o superior. Preferentemente, el anticuerpo no se une detectablemente a dicha diana en caso de hallarse presente a una concentración de hasta 15 nM, preferentemente de hasta 30 nM, preferentemente de hasta 50 nM, preferentemente de hasta 100 nM, preferentemente de hasta 150 nM, o de hasta 170 nM, de hasta 300 mM, de hasta 600 nM, de hasta 1.000 nM, de hasta 1.300 nM o superior. Preferentemente, el anticuerpo no se une detectablemente a dicha diana en caso de hallarse presente a una concentración que satura la unión a la diana a la que se une el anticuerpo, es decir CLDN6. Preferentemente, un anticuerpo no presenta afinidad significativa para una diana en el caso de que se una a dicha diana con una K_D que es por lo menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces o 10^6 veces superior a la K_D para la unión a la diana predeterminada a la que es capaz de unirse el anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de que la K_D para la unión de un anticuerpo a la diana a la que es capaz de unirse el anticuerpo sea de 10^{-7}, la K_D para la unión a una diana para la que el anticuerpo no presenta una afinidad significativa sería de por lo 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 una diana predeterminada en el caso de que se capaz de unirse a dicha diana predeterminada aunque no sea capaz de unirse a otras dianas, es decir, no presenta una afinidad significativa para otras dianas y no se une significativamente a otras dianas en ensayos estándares. Según la enseñanza, un anticuerpo es específico para CLDN6 en el caso de que sea capaz de unirse a CLDN6 pero no sea capaz de unirse a otras dianas, en particular proteínas claudina diferentes de CLDN6 tales como CLDN9, CLDN4, CLDN3 y CLDN1. Preferentemente un anticuerpo es específico para CLDN6 en el caso de que la afinidad y unión para una proteína claudina diferente de CLDN6, tal como CLDN9, CLDN4, CLDN3 y CLDN1 no exceda significativamente la afinidad o unión para proteínas no relacionadas con claudinas, tales como la albúmina de suero bovino (ABS), la caseína, la albúmina sérica humana (ASH) o proteínas transmembranales no claudinas tales como moléculas del CHM o el receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un anticuerpo es específico

para una diana predeterminada en el caso de que se una a dicha diana con una K_D que sea por lo menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces o 10^6 veces inferior a la K_D para la unión a una diana para la que no es específico. Por ejemplo, en el caso de que la K_D para la unión de un anticuerpo a la diana para la que es específico sea 10^{-7} M, la K_D para la unión a una diana para la que no es específico sería de por lo 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 una diana puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions", en: Fundamental Immunology, Paul W.E., editor, Raven Press, New York, NY, 1984; Kuby, Janis, Immunology, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 1992, y métodos descritos en la presente memoria. Las afinidades pueden determinarse fácilmente utilizando técnicas convencionales, tales como la diálisis en el equilibrio, mediante la utilización del instrumento BIAcore 2000, utilizando los procedimientos generales descritos de manera general por el fabricante, mediante radioinmunoensayo utilizando antígeno diana marcado radioactivamente, o mediante otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949. La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar al medirla bajo condiciones diferentes, por ejemplo concentraciones salinas o pH. De esta manera, las mediciones de afinidad y de otros parámetros de la unión de antígenos, por ejemplo la K_D y la IC_{50} preferentemente se llevan a cabo utilizando soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Una característica única del anticuerpo de la presente enseñanza es la capacidad de unirse a claudina-6 de superficie celular. Lo anterior se demuestra mediante análisis de citometría de flujo de las células que expresan claudina-6.

Con el fin de someter a ensayo la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan claudinas, puede utilizarse la citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares que expresan claudinas asociadas a la membrana (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándares) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos en PBS que contiene FCS inactivado por calor al 2% y NaN_3 al 0,1% a 4ºC durante 30 min. Tras el lavado, las células se hacen reaccionar con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente bajo las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante FACS utilizando propiedades lumínicas y de dispersión lateral para separar células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados.

El término "unión" según la enseñanza se refiere preferentemente a una unión específica tal como se define en la presente memoria.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el que la clase, o el isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de IgG a una de las otras clases de Ig.

La expresión "de origen natural" tal como se utiliza en la presente memoria aplicada a un objeto se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleótida que se encuentra presente en un organismo (incluyendo virus) que pueden aislarse a partir de una fuente natural y que no ha sido modificado deliberadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

El término "reorganizado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una configuración de locus de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina en el que un segmento V se encuentra situado inmediatamente contiguo a un segmento D-J o J en una conformación codificante de esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Puede identificarse un locus de gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reorganizado mediante la comparación con el ADN de línea germinal; un locus reorganizado presentará por lo menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

El término "reorganizado" o "configuración de línea germinal" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se encuentra recombinado de manera que sea inmediatamente contiguo a un segmento D o J.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, aunque preferentemente es ADN de doble cadena. Puede utilizarse una molécula de ácidos nucleicos para la introducción en, es decir, la transfección de, células, por ejemplo en forma de ARN, que puede prepararse mediante transcripción *in vitro* a partir de un molde de ADN. Además, el ARN puede modificarse antes de la aplicación con secuencias estabilizadoras, adición de caperuzas y poliadenilación.

Los ácidos nucleicos indicados según la enseñanza preferentemente han sido aislados. La expresión "ácido

nucleico aislado" se refiere según la enseñanza a que el ácido ha sido: (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) producido recombinantemente mediante clonación, (iii) purificado, por ejemplo mediante corte y fraccionamiento mediante electroforesis en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que se encuentra disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

Los ácidos nucleicos pueden, según la enseñanza, encontrarse presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En formas de realización preferentes, un ácido nucleico se encuentra unido funcionalmente a secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dichos ácidos nucleicos, en el que el término "homólogo" se refiere a que el ácido nucleico también se encuentra unido funcionalmente a la secuencia de control de la expresión naturalmente y el término "homólogo" se refiere a que el ácido nucleico no se encuentra unido funcionalmente a la secuencia de control de la expresión de manera natural.

Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia de control de la expresión se encuentran "funcionalmente" unidas entre sí en el caso de que se encuentren unidas covalentemente entre sí de manera que la expresión o la transcripción de dicho ácido nucleico se encuentra bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. En el caso de que el ácido nucleico deba traducirse en una proteína funcional, en este caso, con una secuencia de control de la expresión unida funcionalmente a una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia de control de la expresión resulta en la transcripción de dicho ácido nucleico, sin provocar un desplazamiento de marco en la secuencia codificante o no siendo capaz dicha secuencia codificante de ser traducida en la proteína o péptido deseado.

La expresión "secuencia de control de la expresión" comprende según la enseñanza, promotores, sitios de unión ribosómica, intensificadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En formas de realización particulares, de la enseñanza, las secuencias de control de la expresión pueden estar reguladas. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar como función de la especie o tipo celular, aunque generalmente comprende secuencias 5'-no transcritas y 5'- y 3'-no traducidas que participan en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, las secuencias de adición de caperuza y la secuencia CAAT. Más concretamente, las secuencias de control de la expresión 5'-no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias de control de la expresión pueden comprender además secuencias intensificadoras o secuencias activadoras cadena arriba.

Segçun la enseñanza, el término "promotor", o "región promotora", se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está situada cadena arriba (5') respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa, y controla la expresión de la secuencia al proporcionar un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para factores adicionales que participan en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Además, un promotor puede ser "inducible" y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutivo" en el caso de que la transcripción no esté controlada por un agente inductor. Un gen que se encuentra bajo el control de un promotor inducible y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutiva" en el caso de que la transcripción no esté controlada por un agente inductor. Un gen que se encuentra bajo el control de un promotor inducible no se expresa o sólo se expresa en una medida pequeña en el caso de que no se encuentre presente el agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se activa o se incrementa el nivel de transcripción del mismo. Lo anterior está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

Entre los promotores que resultan preferidos según la enseñanza, se incluyen promotores de la polimerasa SP6, T3 y T7, el promotor humano U6 del ARN, el promotor del CMV y promotores híbridos artificiales de los mismos (por ejemplo del CMV) en los que una parte o partes se fusionan con una parte o partes de promotores de genes de otras proteínas celulares, tales como, por ejemplo, la GAPDH humana (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) e incluyendo o no uno o más intrones adicionales.

Según la enseñanza, el término "expresión" se utiliza en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. Comprende además la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede producirse transitoriamente o establemente. Según la enseñanza, el término expresión incluye además la "expresión aberrante" o la "expresión anormal".

La "expresión aberrante" o la "expresión anormal" se refieren según la presente enseñanza a que la expresión está alterada, preferentemente incrementada, en comparación con una referencia, preferentemente en comparación con el estado en una célula normal no tumorigénica o en un individuo sano. Un incremento de la expresión se refiere a un incremento de por lo menos 10%, en particular de por lo menos 20%, por lo menos 50% o por lo menos 100%. En una forma de realización, la expresión sólo se observa en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se encuentra reprimida.

En una forma de realización preferida, una molécula de ácidos nucleicos se encuentra presente, según la presente enseñanza, en un vector, en caso apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se utiliza en la presente memoria en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario de un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico sea, por ejemplo, introducido en células procarióticas y/o eucarióticas y, en caso apropiado, sea integrado en un genoma. Los vectores de este tipo preferentemente se replican y/o se expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas víricos. El término "plásmido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere de manera general a un constructo de material genético extracromosómico, habitualmente un ADN dúplex circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

Como vector para la expresión de un anticuerpo, puede utilizarse un tipo de vector en el que la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo se encuentran presentes en diferentes vectores, o un tipo de vector en el que la cadena pesada y la cadena ligera se encuentran presentes en el mismo vector.

La enseñanza proporcionada en la presente memoria con respecto a secuencias específicas de ácidos nucleicos y aminoácidos, por ejemplo las mostradas en el listado de secuencias, debe interpretarse de manera que se refiere también a las modificaciones, es decir, las variantes, de dichas secuencias específicas, resultando en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas y las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos específicas. Una importante propiedad es conservar la unión de un anticuerpo a su diana o proporcionar soporte a funciones efectoras de un anticuerpo, tales como CDC y/o ADCC. Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, en el caso de que sustituya la secuencia específica en un anticuerpo, conserva la unión de dicho anticuerpo a la diana y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo tal como se indica en la presente memoria.

De manera similar, la enseñanza proporcionada en la presente memoria con respecto a anticuerpos específicos o hibridomas que producen anticuerpos específicos debe interpretarse como relacionada también con anticuerpos caracterizados porque la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácidos nucleicos se encuentra modificada respecto a la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácidos nucleicos de los anticuerpos específicos, aunque es funcionalmente equivalente. Una propiedad importante es la conservación de la unión del anticuerpo a su diana o que proporciona soporte a funciones efectoras del anticuerpo. Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, en el caso de que sustituya la secuencia específica en el anticuerpo, conserva la unión de dicho anticuerpo a la diana y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

El experto en la materia apreciará que, en particular, las secuencias del CDR, pueden modificarse regiones hipervariables y variables sin perder la capacidad de unirse a la diana. Por ejemplo, las regiones de CDR son idénticas o altamente homólogas respecto a las regiones de los anticuerpos especificados en la presente memoria. La expresión "altamente homólogo" contempla que pueden realizarse entre 1 y 5, preferentemente entre 1 y 4, tal como entre 1 y 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR. Además, la regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren homología sustancial respecto a las regiones de los anticuerpos dados a conocer específicamente en la presente memoria.

Debe apreciarse que los ácidos nucleicos específicos indicados en la presente memoria incluyen también ácidos nucleicos modificados con el fin de optimizar el uso de los codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias de uso de los codones entre organismos pueden conducir a una diversidad de problemas relacionados con la expresión génica heteróloga. La optimización de los codones mediante la modificación de uno o más nucleótidos de la secuencia original puede resultar en una optimización de la expresión del ácido nucleico, en particular la optimización de la eficacia de la traducción, en un huésped homólogo o heterólogo en el que debe expresarse dicho ácido nucleico.

Según la enseñanza, una variante, derivado, forma o fragmento modificado de una secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos, o péptido, preferentemente presenta una propiedad funcional de la secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos, o péptido, respectivamente, a partir del que se ha derivado. Dichas propiedades funcionales comprenden la interacción o la unión a otras moléculas. En una forma de realización, una variante, derivado, forma o fragmento modificado de una secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos, o péptido, es inmunológicamente equivalente a la secuencia de ácidos nucleicos, secuencia de aminoácidos, o péptido, respectivamente, a partir del que se ha derivado.

Preferentemente, el grado de identidad entre una secuencia de ácidos nucleicos específica y una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido modificada con respecto a, o que es una variante de, dicha secuencia de ácidos nucleicos específica, será de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 75%, más preferentemente de por lo menos 80%, todavía más preferentemente de por lo menos 90% o todavía más preferentemente de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes de ácidos nucleicos de CLDN6, el grado de

identidad preferentemente se proporciona a una región de por lo menos aproximadamente 300, por lo menos aproximadamente 400, por lo menos aproximadamente 450, por lo menos aproximadamente 500, por lo menos aproximadamente 550, por lo menos aproximadamente 600 o por lo menos aproximadamente 630 nucleótidos. En formas de realización preferentes, se proporciona el grado de identidad para la longitud entera de la secuencia de ácidos nucleicos de referencia, tal como las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el listado de secuencias. Preferentemente, las dos secuencias son capaces de hibridarse y formar un dúplex estable entre sí, llevándose a cabo preferentemente la hibridación bajo condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones restrictivas). Las condiciones restrictivas se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook *et al.*, editores, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, Inc., New York, y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65ºC en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02%, NaH_2PO_4 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro sódico 0,15 M/citrato sódico 0,15 M, pH 7. Tras la hibridación, se lava la membrana a la que se ha transferido el ADN, por ejemplo en 2 x SSC a temperatura ambiente y después en 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68ºC.

El término "variante" según la enseñanza también incluye mutantes, variantes de procesamiento, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes específicas y homólogos específicos, en particular aquellos que se encuentran presentes naturalmente. Una variante alélica se refiere a una alteración de la secuencia normal de un gel, el significado de la cual con frecuencia no está claro. La secuencia génica completa con frecuencia identifica numerosas variantes alélicas para un gen dado. Un homólogo específico es una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos con una especie de origen diferente de la de una secuencia dada de ácidos nucleicos o de aminoácidos.

En el contexto de la presente memoria, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes por inserción de aminoácido, variantes por adición de aminoácido, variantes por deleción de aminoácido y/o variantes por sustitución de aminoácido. Las variantes por deleción de aminoácido que comprenden la deleción en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también se denominan variantes por truncado N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes por inserción de aminoácido comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia particular de aminoácidos. En el caso de las variantes de secuencia de aminoácido que presentan una inserción, se insertan uno o más residuos aminoácidos en un sitio particular de una secuencia de aminoácidos, aunque también resulta posible la inserción aleatoria con un cribado apropiado del producto resultante.

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

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

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

Con respecto a la secuencia de aminoácidos según SEC ID nº 37, el término "variante" se refiere en particular a una secuencia en la que la cisteína en la posición 46 es sustituida por otro aminoácido diferente de cisteína, tal como un aminoácido indicado anteriormente, preferentemente glicina, alanina, serina, treonina, valina o leucina.

Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente identidad, entre una secuencia específica de aminoácidos y una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada con respecto a, o que es una variante de, dicha secuencia específica de aminoácidos, tal como entre secuencias de aminoácidos que muestran una homología sustancial, es de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menso 80%, todavía más preferentemente de por lo menos 90%, o todavía más preferentemente de por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o identidad se proporciona preferentemente para una región de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por

lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, en el caso de que la secuencia de aminoácidos de referencia consista de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se proporciona preferentemente para por lo menos aproximadamente 20, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 60, por lo menos aproximadamente 80, por lo menos aproximadamente 100, por lo menos aproximadamente 120, por lo menos aproximadamente 140, por lo menos aproximadamente 160, por lo menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferentemente aminoácidos contiguos. Con respecto a las variantes del polipéptido CLDN6, el grado de similitud o identidad se proporciona preferentemente para una región de por lo menos aproximadamente 100, por lo menos aproximadamente 120, por lo menos aproximadamente 140, por lo menos aproximadamente 160, por lo menos aproximadamente 180, por lo menos aproximadamente 200 o por lo menos aproximadamente 210 aminoácidos. En formas de realización preferentes, el grado de similitud o identidad se proporciona para la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia, tal como las secuencias de aminoácidos proporcionadas en el listado de secuencias. La alineación para determinar la similitud de secuencias, preferentemente la identidad de secuencias, puede llevarse a cabo con herramientas conocidas de la técnica, preferentemente utilizando la alineación de mejor secuencia, por ejemplo utilizando Align, con una configuración estándar, preferentemente EMBOSS::needle, matriz: Blosum62, apertura de hueco: 10,0, extensión de hueco: 0,5.

La "similitud de secuencias" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservadoras. La "identidad de secuencias" entre dos secuencias de polipéptido o de ácidos nucleicos indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre secuencias.

El "porcentaje de identidad" se obtiene después de realizar la alineación óptima, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando distribuidas las diferencias entre las dos secuencias de manera aleatoria y a lo largo de su longitud completa. Las comparaciones entre secuencias al comparar dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias tras alinearlas óptimamente, llevando a cabo dicha comparación segmento a segmento o mediante "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud de secuencias. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede producirse, aparte de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Ads. App. Math. 2:482, 1981; mediante el algoritmo de homologías locales de Neddleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, o mediante programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA, en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calculó determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones que se comparan y multiplicando el resultado obtenido por 100 de manera que se obtiene el porcentaje de identidad entre dichas dos secuencias.

Pueden realizarse "sustituciones conservadoras", por ejemplo, basadas en la similitud de polaridades, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofilicidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) entre los aminoácidos no polares (hidrófobos) se incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina, (b) entre los aminoácidos neutros polares se incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina, (c) entre los aminoácidos cargados positivamente (básicos) se incluyen arginina, lisina e histidina, y (d) entre los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Pueden llevarse a cabo sustituciones típicamente dentro de los grupos (a) a (d). Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse una por otra basándose en su capacidad de alterar las hélices α. Pueden llevarse a cabo algunas sustituciones preferentes entre los grupos siguientes: (i) S y T, (ii) P y G, e (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto en la materia podrá construir fácilmente los ADN codificantes de variantes conservadoras de aminoácidos.

La presente enseñanza comprende anticuerpos en los que se han llevado a cabo alteraciones en la región Fc con el fin de modificar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden resultar en una reducción o incremento de la unión de C1q y CDC o de la unión de FcγR y ADCC. Pueden llevarse a cabo sustituciones en, por ejemplo, uno o más de los residuos aminoácidos de la región constante de cadena pesada, provocando de esta manera una alteración de la función efectora, conservando simultáneamente la capacidad de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, ver las patentes US nº 5.624.821 y nº 5.648.260.

La semivida *in vivo* de los anticuerpos puede mejorarse mediante la modificación del epítopo del receptor de reciclaje del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig de manera que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, ver las patentes US nº 6.121.022 y nº 6.194.551. La semivida *in vivo* puede incrementarse además realizando mutaciones en la región Fc, por ejemplo mediante la sustitución de la treonina por la leucina en la posición 252, mediante la sustitución de la treonina por la serina en la posición 254, o mediante la sustitución de la treonina por la fenilalanina en la posición 256, ver la patente US nº 6.277.375.

Además, el patrón de glucosilación de los anticuerpos puede modificarse con el fin de modificar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de incrementar la afinidad de la región Fc para los receptores de Fc, los cuales, a su vez, resultarán en una ADCC incrementada de los anticuerpos en presencia de células NK, ver Shield *et al.*, JBC 277:26733, 2002. Además, puede modificarse la galactosilación con el fin de modificar la CDC.

Alternativamente, en otra forma de realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-CLDN6, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CLDN6 modificados resultantes pueden cribarse para la actividad de unión.

Según la enseñanza, el término "célula" o "célula huésped" preferentemente se refiere a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales, tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta preferentemente es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferentemente, dicho término se refiere según la enseñanza a cualquier célula que pueda transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye según la enseñanza células procarióticas (por ejemplo *E. coli*) o células eucarióticas (por ejemplo células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células HEK293, células HELA, células de levadura y células de insecto). El ácido nucleico exógeno puede encontrarse en el interior de la célula (i) libremente dispersado, (ii) incorporado en un vector recombinante, o (iii) integrado en el genoma de la célula huésped o en el ADN mitocondrial. Las células de mamífero resultan particularmente preferentes, tales como células de seres humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de un gran número de tipos de tejidos y entre ellas se incluyen células y líneas celulares primarias. Entre los ejemplos específicos se incluyen queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En formas de realización adicionales, la célula es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago. La expresión "célula huésped", tal como se utiliza en la presente memoria, preferentemente pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante.

Una célula que comprende una molécula de ácidos nucleicos preferentemente expresa el péptido o la proteína codificado por el ácido nucleico.

La expresión "animal transgénico" se refiere a un animal que presenta un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que preferentemente es capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede presentar 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-CDLN6 humanos al inmunizarse con el antígeno CLDN6 y/o células que expresan CLDN6. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, tal como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo los ratones HuMAb, tal como los ratones HCo7 o HCol2, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, tal como es el caso para los ratones transcromosómicos (por ejemplo KM) tal como se indican en el documento nº WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CLDN6 (por ejemplo IgG, IgA y/o IgE) sometiéndolos a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

El término "reducir" o "inhibir" tal como se utiliza en la presente memoria significa la capacidad de provocar un descenso general, preferentemente del 5% o más, del 10% o más, del 20% o más, más preferentemente del 50% o más, de manera más preferida del 75% o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de proliferación de células. El término “inhibir” o frases similares incluye una inhibición completa o esencialmente completa, es decir, una reducción a cero o esencialmente a cero.

Los términos tales como "incrementar" o "intensificar" se refieren preferentemente a un incremento o intensificación en aproximadamente por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 20%, preferentemente por lo menos 30%, preferentemente por lo menos 40%, más preferentemente por lo menos 50%, todavía más preferentemente por lo menos 80%, y todavía más preferentemente por lo menos 100%. Estos términos pueden referirse además a circunstancias en las que en el tiempo cero no hay ninguna señal detectable para un determinado compuesto o condición y en un punto temporal particular posterior al tiempo cero hay una señal detectable de un determinado compuesto o condición.

La expresión "inmunológicamente equivalente" se refiere a que la molécula inmunológicamente equivalente, tal como la secuencia de aminoácidos inmunológicamente equivalente, muestra las mismas o esencialmente las mismas propiedades inmunitarias y/o ejerce los mismos o esencialmente los mismos efectos inmunológicos, por ejemplo con respecto al tipo de efecto inmunológico, tal como la inducción de una respuesta inmunológica humoral y/o celular, la intensidad y/o la duración de la reacción inmunológica inducida, o la especificidad de la reacción inmunológica inducida. En el contexto de la presente enseñanza, la expresión "inmunológicamente equivalente" preferentemente se utiliza con respecto a los efectos o propiedades inmunitarias de un péptido o variante peptídica

utilizado para la inmunización. Una propiedad inmunológica particular es la capacidad de unirse a anticuerpos y, en caso apropiado, generar una respuesta inmunológica, preferentemente mediante la estimulación de la generación de anticuerpos. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos es inmunológicamente equivalente a una secuencia de aminoácidos de referencia en el caso de que dicha secuencia de aminoácidos al exponerla al sistema inmunológico de un sujeto induzca una reacción inmunológica, preferentemente de anticuerpos, con una especificidad de reacción con la secuencia de aminoácidos de referencia, tal como la secuencia de aminoácidos de referencia que forma parte de CLDN6.

La expresión "funciones efectoras inmunitarias" en el contexto de la presente enseñanza incluye cualesquiera funciones mediadas por componentes del sistema inmunológico que resultan en la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, incluyendo la inhibición de la diseminación y metástasis tumorales. Preferentemente, las funciones efectoras inmunitarias resultan en la eliminación de células tumorales. Preferentemente, las funciones efectoras inmunitarias en el contexto de la presente enseñanza son funciones efectoras mediadas por anticuerpos. Dichas funciones comprenden citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado a tumor, por ejemplo mediante la unión del anticuerpo a un antígeno de superficie, y/o la inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor, preferentemente ADCC y/o CDC. De esta manera, los anticuerpos que son capaces de mediar en una o más funciones efectoras inmunitarias preferentemente son capaces de mediar en la eliminación de células mediante la inducción de lisis mediada por CDC, lisis mediada por ADCC, apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente mediante la inducción de lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Los anticuerpos también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a antígenos asociados a tumor sobre la superficie de una célula tumoral. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado a tumor o inducir la apoptosis únicamente mediante unión al antígeno asociado a tumor sobre la superficie de una célula tumoral.

Descripción detallada

Mecanismos de acción de mAb

A continuación se proporcionan consideraciones sobre el mecanismo que subyace a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la enseñanza.

Los anticuerpos indicados en la presente memoria pueden interactuar con componentes del sistema inmunológico, preferentemente mediante ADCC o CDC. Los anticuerpos de la enseñanza también pueden utilizarse para dirigir cargas (por ejemplo isótopos radioactivos, fármacos o toxinas) para eliminar directamente células tumorales, o pueden utilizarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando los tumores mediante mecanismos de acción complementarios entre los que pueden incluirse respuestas inmunitarias antitumorales que podrían encontrarse comprometidas por los efectos secundarios citotóxicos de un quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de la enseñanza pueden ejercer también un efecto simplemente mediante la unión a CLDN6 sobre la superficie celular, bloqueando de esta manera, por ejemplo, la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

La ADCC se refiere a la capacidad de eliminación de células de células efectoras tales como las indicadas en la presente memoria, en particular linfocitos, que preferentemente requiere que la célula diana sea marcada con un anticuerpo.

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

Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC es otro método de eliminación de células que puede ser dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también son muy efectivos en la dirección de CDC mediante la ruta clásica de activación del complemento. Preferentemente, en dicha cascada la formación de complejos de antígeno-anticuerpo resulta en el destapado de múltiples sitios de unión a C1q en estrecha proximidad a los dominios C_H2 de las moléculas de anticuerpo participantes, tales como moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estos sitios de unión a C1q destapados convierten la interacción C1q-IgG, previamente de baja afinidad, en una interacción de elevada avidez, que desencadena una cascada de sucesos que implica una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la

liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de célula efectora C3a y C5a. Preferentemente, la cascada del complemento finaliza en la formación de un complejo de ataque membranal que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos hacia el interior y exterior de la célula.

Producción de anticuerpos

Pueden producirse anticuerpos de la enseñanza mediante una diversidad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975. Aunque resultan preferentes los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio pueden utilizarse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B o técnicas de expresión fágica utilizando bibliotecas de genes de anticuerpo.

El sistema animal preferida para preparar 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 son conocidos en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

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

En todavía otra forma de realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLDN6 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunológico humano y no del sistema del ratón. Entre estos ratones transgénicos y transcromosómicos se incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente memoria como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en dichos ratones transgénicos puede llevarse a cabo tal como se indica en detalle para CD20 en el documento nº WO 2004/035607.

Todavía otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente los genes codificantes de los anticuerpos a partir de linfocitos productos de anticuerpos de estrategia definida, por ejemplo ver Babcock *et al.*, A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy, 1996. Para más información sobre la ingeniería de anticuerpos recombinantes, ver también Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy, ISBN nº 0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo, Antibody Engineering, ISBN nº 1-58829-092-1.

Inmunizaciones

Con el fin de generar anticuerpos contra CLDN6, pueden inmunizarse ratones con péptidos conjugados con portador derivados de la secuencia de CLDN6, una preparación enriquecida de antígeno CLDN6 expresado recombinantemente o fragmentos del mismo y/o células que expresan CLDN6 o fragmentos del mismo, tal como se indica. Alternativamente, pueden inmunizarse ratones con ADN codificante de CLDN6 humano de longitud completa o fragmentos del mismo. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CLDN6 no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CLDN6, por ejemplo una línea celular, con el fin de estimular respuestas inmunitarias.

Puede llevarse a cabo un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización utilizando muestras de plasma o suero que se obtienen mediante sangrados de la vena de la cola o retroorbitales. Para las fusiones pueden utilizarse ratones con suficiente título de inmunoglobulina anti-CLDN6. Los ratones pueden recibir un refuerzo intraperitoneal o intravenoso de células expresantes de CLDN6 3 a 5 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para incrementar la tasa de hibridomas secretores de anticuerpos específicos.

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

Con el fin de generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra CLDN6, pueden aislarse células de los nódulos linfáticos o bazos obtenidos de ratones inmunizados, y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes seguidamente pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. A continuación, pueden cribarse pocillos individuales mediante ELISA para los hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y de FACS utilizando células expresantes de CLDN6, pueden identificarse los anticuerpos con especificidad para CLDN6. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden sembrarse en placa nuevamente, cribarse nuevamente y, en caso de que todavía sean positivos para anticuerpos monoclonales anti-CLDN6, pueden subclonarse mediante dilución limitante. Seguidamente los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* con el fin de generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la enseñanza también pueden producirse en un transfectoma de la célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica tales como los bien conocidos de la técnica (Morrison S., Science 229:1202, 1985).

Por ejemplo, en una forma de realización, el gen o genes de interés, por ejemplo los genes de anticuerpo, pueden ligarse en un vector de expresión, tal como un plásmido de expresión eucariótico, tal como se utiliza por el sistema de expresión génica GS dado a conocer en el documento nº WO 87/04462, el documento nº WO 89/01036 y en la patente EP nº 0 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos de la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados pueden introducirse en células huésped eucarióticas, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucarióticas como células derivadas de plantas, células fúngicas o células de levadura. El método utilizado para introducir estos genes pueden ser uno de entre los métodos descritos en la técnica, tales como la electroporación, la lipofectina, la lipofectamina u otros. Tras la introducción de estos genes de anticuerpo en las células huésped, pueden identificarse y seleccionarse las células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que seguidamente pueden amplificarse para su nivel de expresión y ampliar la escala para producir anticuerpos. Pueden aislarse y purificarse anticuerpos recombinantes a partir de dichos sobrenadantes y/o células de cultivo.

Alternativamente, los genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procarióticas, tales como microorganismos, por ejemplo *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tal como en leche de oveja y conejo o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas; ver, por ejemplo, Verma R. *et al.*, J. Immunol. Meth. 216:165-181, 1998; Pollock *et al.*, J. Immunol. Meth. 231:147-157, 1999, y Fischer R. *et al.*, Biol. Chem. 380:825-839, 1999.

Utilización de secuencias parciales de anticeurpo para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización)

a) Quimerización

Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales murinos como anticuerpos terapéuticos en el ser humano al marcarlos con toxinas o isótopos radioactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el ser humano al aplicarse repetitivamente, conduciendo a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el ser humano puede reducirse o evitarse por completo en el caso de que los anticuerpos respectivos se quimericen o se humanicen. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos las diferentes partes de los cuales se derivan de diferentes especies animales, tales como los que presentan una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de los anticuerpos se consigue mediante 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 humanas (por ejemplo tal como se indica en Kraus *et al.*, en: Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy, ISBN nº 0-89603-918-8). En una forma de realización preferente, se generan anticuerpos quiméricos mediante la unión una región constante de cadena ligera kappa humana con una región variable de cadena ligera murina. En una forma de realización también preferente, pueden generarse anticuerpos quiméricos mediante la unión de una región constante de cadena ligera lambda humana con la región variable de cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferentes para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferentes para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (RDC) de las cadenas pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que en secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, resulta posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias de marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1998; Jones P. *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989). Dichas secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias génicas del anticuerpo maduro porque no incluyen los genes variables completamente ensamblados, los cuales se forman mediante la unión V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo secundario de repertorio de alta afinidad en bases individuales uniformemente a lo largo de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte aminoterminal de la región de marco 1 y en la parte carboxiterminal de la región de marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo no

resulta necesario obtener la secuencia de ADN entera de un anticuerpo particular con el fin de recrear una anticuerpo recombinante intacto que presente propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (ver el documento nº WO 99/45962). Con este fin típicamente resultan suficientes secuencias parciales de las cadenas pesada y ligera que comprenden las regiones de CDR. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de la línea germinal han contribuido a los genes variables del anticuerpo recombinado. A continuación, se utiliza la secuencia de línea germinal para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias faltantes, pueden combinarse secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, puede sintetizarse la región variable entera en forma de un grupo de oligonucleótidos cortos solapantes y combinarse mediante amplificación por PCR con el fin de crear un clon de región variable completamente sintética. Este procedimiento presenta determinadas ventajas, tales como la eliminación o la inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de las cadenas pesada y ligera de los hibridomas se utilizan para diseñar un grupo solapante de oligonucleótidos sintéticos con el fin de crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y kappa pueden diferir de las de las secuencias naturales en tres maneras: series de bases de nucleótido repetidas interrumpidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de traducción óptimos siguiendo las reglas de Kozak (Kozak, J. Biol. Chem. 266:19867-19870, 1991) y se introducen sitios HindIII cadena arriba de los sitios de inicio de traducción.

Para las regiones variables de tanto cadena pesada como ligera, las secuencias optimizadas de cadena codificante y las correspondientes no codificantes se fragmentan en 30 a 50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. De esta manera, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en grupos de de doble cadena solapantes que comprenden segmentos de 150 a 400 nucleótidos. A continuación, los pools se utilizan como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 a 400 nucleótidos. Típicamente se fragmenta un único grupo de oligonucleótidos de región variable en dos pools que se amplifican separadamente para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes seguidamente se combinan mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede resultar deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en los constructos de vector de expresión.

Las regiones variables de cadenas pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas seguidamente se combinan con secuencias clonadas de promotor, líder, inicio de traducción, región constante, 3'-no traducida, de poliadenilación y de terminación de la transcripción con el fin de formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de las cadenas pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectado, transfectado en serie o separadamente transfectado en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas. Se describen plásmidos para la utilización en la construcción de vectores de expresión para la IgGκ humana. Los plásmidos pueden construirse de manera que las secuencias de ADNc de cadena pesada V y cadena ligera kappa V amplificadas por PCR puedan utilizarse para reconstruir los minigenes de cadenas pesada y ligera completos. Estos plásmidos pueden utilizarse para expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa completamente humanos o quiméricos. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

De esta manera, en otro aspecto de la enseñanza, se utilizan las características estructurales de los anticuerpos anti-CLDN6 de la enseñanza para crear anticuerpos anti-CLDN6 humanizados estructuralmente relacionados que conservan por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la enseñanza, tales como la unión a CLDN6. Más específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse recombinantemente con regiones de marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-CLDN6 humanizados manipulados recombinantemente adicionales de la enseñanza.

Unión a células expresantes de antígenos

La capacidad del anticuerpo de unirse a CLDN6 puede determinarse utilizando ensayos de unión estándares, tales como los proporcionados en los ejemplos (por ejemplo ELISA, transferencia western, análisis de inmunofluorescencia y de citometría de flujo).

Aislamiento y caracterización de anticuerpos

Con el fin de purificar anticuerpos anti-CLDN6, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrifugación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos anti-CLDN6 en biorreactores basados en la diálisis. Pueden filtrarse los sobrenadantes y, en caso necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa.

Puede comprobarse la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS y puede determinarse la concentración a partir de la DO280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80ºC.

Con el fin de determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 seleccionados se unen a epítopos únicos, puede utilizarse la mutagénesis dirigida a sitio o dirigida a múltiples sitios.

Determinación del isotipo

Con el fin de determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden llevarse a cabo ELISA de isotipo con diversos kits comerciales (por ejemplo Zymed, Roche Diagnostics). Los pocillos de placas de microtitulación pueden recubrirse con Ig antirratón. Tras el bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, los pocillos pueden hacerse reaccionar con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgA o IgM de ratón. Tras el lavado, las placas pueden revelarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una DO de entre 405 y 650. Alternativamente, el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, nº de cat. 1493027) puede utilizarse tal como indica el fabricante.

Análisis de citometría de flujo

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLDN6 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLDN6, puede utilizarse la citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan naturalmente o tras la transfección CLDN6 y los controles negativos que no presentan expresión de CLDN6 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándares) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene FBS al 1%, y pueden incubarse a 4ºC durante 30 min. Tras el lavado, el anticuerpo anti-IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse a anticuerpo monoclonal unido a CLDN6 bajo las mismas condiciones que la tinción con anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un instrumento de FACS utilizando las propiedades lumínicas y de dispersión lateral para separar células vivas individuales. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de CLDN6 de los ligantes no específicos en una única medición, puede utilizarse el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos codificantes de CLDN6 y un marcador fluorescente pueden teñirse tal como se ha indicado anteriormente. Las células transfectadas pueden detectarse en un canal fluorescente diferente que las células teñidas con anticuerpo. Debido a que la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de CLDN6 se unen preferentemente a células expresantes de marcador fluorescente, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a células no transfectadas. Puede utilizarse un ensayo alternativo utilizando microscopía de fluorescencia además de, o en lugar de, el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente tal como se ha indicado anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Microscopía de inmunofluorescencia

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLDN6 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLDN6, puede utilizarse el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, se cultivan líneas celulares que expresan CLDN6 espontáneamente o después de la transfección y controles negativos que no presentan expresión de CLDN6 en portaobjetos con cámara bajo condiciones de crecimiento estándares en medio DMEM/F12, complementado con suero de feto bovino al 10% (SFB), L-glutamina 2 mM, 100 IU/ml de penicilina y estreptomicina 100 µg/ml. A continuación, las células pueden fijarse con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Seguidamente las células pueden hacerse reaccionar con anticuerpos monoclonales contra CLDN6 durante 30 minutos a 25ºC. Tras el lavado, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) bajo las mismas condiciones. A continuación, las células pueden examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Pueden observarse los niveles totales de CLDN6 en las células tras fijarse con metanol o paraformaldehído y permeabilizarse con Triton X-100. En células vivas y no permeabilizadas, puede examinarse la localización en superficie de CLDN6 en células fijadas con paraformaldehído. Puede analizarse la dirección de CLDN6 a uniones estrechas mediante cotinción con marcadores de unión estrecha tales como ZO-1. Además, pueden examinarse los efectos de la unión de anticuerpos y la localización de CLDN6 dentro de la membrana celular.

Transferencia western

Las IgG anti-CLDN6 pueden someterse a ensayo adicionalmente para la reactividad con el antígeno CLDN6 mediante transferencia western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CLDN6 y controles negativos apropiados y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS). Tras la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se

bloquean y se sondean con los anticuerpos monoclonales que deben someterse a ensayo. La unión de IgG puede detectarse utilizando IgG antirratón-peroxidasa y revelarse con sustrato ECL.

Inmunohistoquímica

Las IgG de ratón anti-CLDN6 pueden someterse a ensayo adicionalmente con antígeno CLDN6 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por el experto en la materia, por ejemplo utilizando criosecciones fijadas en paraformaldehído o acetona o secciones de tejido incluidas en parafina fijadas con paraformaldehído procedentes de muestras de tejido no canceroso o de tejido canceroso, obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones que portaban tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresaban CLDN6 espontáneamente o después de la transfección. Para la inmunotinción, pueden incubarse anticuerpos reactivos con CLDN6 seguido de anticuerpos de cabra antirratón o anticonejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Actividades de fagocitosis y eliminación celular de los anticuerpos *in vitro*

Además de unirse específicamente a CLDN6, los anticuerpos anti-CLDN6 pueden someterse a ensayo para su capacidad de mediar en la fagocitosis y en la eliminación de las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular. El ensayo de la actividad de los anticuerpos monoclonales *in vitro* proporcionará un cribado inicial previo al ensayo de los modelos *in vivo*.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

Brevemente, pueden purificarse células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, procedentes de donantes sanos, mediante centrifugación de densidad en Ficoll Hypaque, seguido de la lisis de los eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI complementado con suero de feto bovino inactivado por calor al 10% o, alternativamente, con suero humano inactivado por calor al 5% y mezclarse con células diana marcadas con ^{51}Cr que expresan CLDN6 y caracterizarse por la asociación de CLDN6 a su superficie celular, en diversas proporciones de células efectoras a células diana. Alternativamente, las células diana pueden marcarse con un ligando intensificador de fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de europio con el ligando intensificador que es liberado de las células muertas puede medirse con un fluorímetro. Otra técnica alternativa puede utilizarse la transfección de las células diana con luciferasa. A continuación, puede oxidarse el amarillo lucifer añadido por únicamente las células viables. Seguidamente puede añadirse IgG anti-CLDN6 purificados a diversas concentraciones. Puede utilizarse IgG humana irrelevante a modo de control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4 a 20 horas a 37ºC dependiendo del tipo de célula efectora utilizada. Las muestras pueden someterse a ensayo para citolisis mediante la medición de la liberación de ^{51}Cr o la presencia del quelato EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida de células viables.

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 también pueden someterse a ensayo en diversas combinaciones para determinar si la citolisis resulta intensificada con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Pueden someterse a ensayo anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 para su capacidad de mediar en la CDC utilizando una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, puede obtenerse suero para complemento de sangre e una manera conocida por el experto en la materia. Para determinar la actividad de CDC de los mAb pueden utilizarse métodos diferentes. La liberación de ^{51}Cr puede, por ejemplo, medirse o puede evaluarse la permeabilidad membranal elevada, utilizando una ensayo de exclusión de yoduro de propidio (YP). Brevemente, pueden levarse las células diana y pueden incubarse $5x10^5$/ml con diversas concentraciones de mAb durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente o a 37ºC. A continuación, puede añadirse suero o plasma hasta una concentración final de 20% (v/v) e incubarse las células a 37ºC durante 20 a 30 minutos. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución de YP en un tubo para FACS. A continuación, la mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo utilizando un FACSArray.

En un ensayo alternativo, puede determinarse la inducción de CDC sobre las células adherentes. En una forma de realización de dicho ensayo, se siembran células 24 h antes del ensayo a una densidad de $3x10^4$/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. Al día siguiente se saca el medio de crecimiento y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o con medio de crecimiento que contiene saponina al 0,2%, para la determinación del nivel de lisis de fondo y de lisis máxima, respectivamente. Tras incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se saca el sobrenadante y se añade plasma o suero humano al 20% (v/v) en DMEM (precalentado a 37ºC) a las células y se incuban durante 20 minutos adicionales a 37ºC. Se añaden todas las células de cada muestra a solución de yoduro de propidio (10 µg/ml). A continuación, se sustituyen los sobrenadantes por PBS que contiene 2,5 µg/ml de bromuro de etidio y se midió a 600 nm la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm, utilizando un instrumento Tecan Safire. Se calculó

el porcentaje de lisis específica de la manera siguiente: % de lisis específica=(fluorescencia de muestra-fondo de fluorescencia)/(fluorescencia de lisis máxima-fluorescencia de fondo) x 100.

Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

Con el fin de someter a ensayo la capacidad de iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas para CLDN6 o células tumorales transfectadas con CLDN6, a 37ºC durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden recolectarse, lavarse en tampón de unión de anexina-V (BD Biosciences) e incubarse con anexina-V conjugada con FITC o APC (BD Biosciences) durante 15 minutos en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a solución de YP (10 µg/ml en PBS) en un tubo para FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (tal como anteriormente). Alternativamente, puede detectarse una inhibición general de la proliferación celular con anticuerpos monoclonales utilizando kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, nº de cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrDU) durante la síntesis del ADN de las células proliferantes en microplacas. Se detectó el BrdU incorporado utilizando un anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección del anticuerpo, las células se fijaron y el ADN se desnaturalizó utilizando solución Fix. El anticuerpo no unido se eliminó mediante lavado y se añadió el inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, en donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida, utilizando fluorimetría con resolución temporal en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pocillo.

Estudios preclínicos

Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLDN6 también pueden someterse a ensayo en un modelo *in vivo* (por ejemplo en ratones inmunodeficientes que portan tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLDN6, posiblemente tras la transfección) con el fin de determinar su eficacia en el control del crecimiento de las células tumorales expresantes de CLDN6.

Los estudios *in vivo* tras el xenoinjertado de células tumorales expresantes de CLDN6 en ratones inmunocomprometidos o en otros animales pueden llevarse a cabo utilizando anticuerpos de la enseñanza. Pueden administrarse anticuerpos en ratones libres de tumores seguido de la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para evitar la formación de tumores o síntomas relacionados con tumores. Los anticuerpos pueden administrarse en ratones portadores de tumor para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos en la reducción del crecimiento tumoral, la metástasis o síntomas relacionados con el tumor. La aplicación de anticuerpos puede combinarse con la aplicación de otras sustancias, tales como fármacos citostáticos, inhibidores de factor de crecimiento, bloqueantes del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos con el fin de determinar la eficacia sinérgica y toxicidad potencial de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por anticuerpos de la enseñanza, los animales pueden recibir la inoculación de anticuerpos o reactivos de control e investigarse a fondo para síntomas posiblemente relacionados con la terapia de anticuerpos de CLDN6. Entre los posibles efectos secundarios de la aplicación *in vivo* de anticuerpos de CLDN6 se incluyen particularmente la toxicidad en tejidos que expresan CLDN6, incluyendo la placenta. Los anticuerpos que reconocen CLDN6 en el ser humano y en otras especies, por ejemplo ratones, resultan particularmente útiles para predecir los potenciales efectos secundarios mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales de CLDN6 en el ser humano.

Mapeado de epítopos

El mapeado de epítopos reconocidos por los anticuerpos de la enseñanza puede llevarse a cabo tal como se indica en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)", de Glenn E. Morris, ISBN 089603-375-9, y en "Epitope Mapping: A Practical Approach", Practical Approach Series, 248, de Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay.

I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CLDN6

En todavía otra forma de realización, de la enseñanza, los anticuerpos de CLDN6 pueden derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo otro péptido o proteína (por ejemplo un fragmento Fab') con el fin de generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítopos diana. Por ejemplo, un anticuerpo de la enseñanza puede unirse funcionalmente (por ejemplo mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación covalente o de otro modo) a otra u otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para CLDN6 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítopo diana. En realización particular de la enseñanza, el segundo epítopo diana es un receptor de Fc, por ejemplo Fc-gammaRI (CD64) o un receptor de Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de célula T, por ejemplo CD3. Por lo tanto, la enseñanza incluye moléculas biespecíficas y

multiespecíficas capaces de unirse a células efectoras que expresan Fc-gammaR, Fc-alfaR o Fc-épsilonR (por ejemplo monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) y a células diana que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden presentar como diana células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 en su superficie celular a células efectoras, y pueden inducir actividades de células efectoras mediadas por receptores de Fc, tales como la fagocitosis de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

Entre las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza puede incluirse adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CLDN6. En una forma de realización, la tercera especificidad de unión es una parte anti-factor de intensificación (FI), pro ejemplo una molécula que se une a proteína de superficie que participa en la actividad citotóxica e incrementa de esta manera la respuesta inmunológica contra la célula diana. La "parte anti-factor intensificador" puede ser un anticuerpo, fragmento funcional de anticuerpo o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo un antígeno o un receptor, y resulta de esta manera en una intensificación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de célula diana. La "parte anti-factor intensificador" puede unirse a un receptor de Fc o a n antígeno de la célula diana. Alternativamente, la parte anti-factor intensificador puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primear y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte anti-factor intensificador puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunológica que resulte en una respuesta inmunológica incrementada contra la célula diana).

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñza comprenden como especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligeras o cadenas pesadas, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla, tal como se indica en Ladner *et al.*, patente US nº 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina, tal como se da a conocer en los documentos nº US 2003/0118592 y nº US 2003/0133939.

En una forma de realización, algunas moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza comprenden una especificidad de unión para un Fc-gammaR o un Fc-alfaR presente sobre la superficie de una célula efectora y una segunda especificidad de unión para un antígeno de la célula diana, por ejemplo CLDN6.

En una forma de realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, la unión del cual no resulta bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o solubles que se agrupan en tres clases de receptor de Fc-gamma: Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) y FcgammaRIII (CD16). En una forma de realización preferente, el receptor de Fc-gamma es un Fc-gammaRI de alta afinidad humano.

En todavía otras formas de realización preferentes, la especificidad de unión para un receptor de Fc se proporciona mediante un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo un receptor de Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), la unión del cual preferentemente no resulta bloqueada por la inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen alfa (Fc-alfaRI) situado en el cromosoma 19. Es conocido que este gen codifica varias isoformas transmembrana alternativamente procesadas de 55 a 110 kDa. Fc-alfaRI (CD89) se expresa constitutivamente sobre monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofílicos, pero no sobre poblaciones celulares no efectoras. Fc-alfaRI presenta una afinidad intermedia para tanto IgA1 como IgA2, que se incrementa con la exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton H.C. *et al.*, Critical Reviews in Immunology 16:423-440, 1996). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicas para Fc-alfaRI, identificadas como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión de ligando de IgA (Monteiro R.C. *et al.*, J. Immunol. 148:1764).

En otra forma de realización, la molécula biespecífica comprende dos anticuerpos monoclonales según la enseñanza que presentan actividades funcionales complementarias, tal como un anticuerpo que funciona predominantemente mediante la inducción de CDC y otro anticuerpo que funciona predominantemente mediante la inducción de apoptosis.

Un "anticuerpo específico de células efectoras" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de las células efectoras. Los anticuerpos preferentes para la utilización en la presente enseñanza se unen al receptor de Fc de las células efectoras en un sitio que no se une a las inmunoglobulinas endógenas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunológica que participa en la etapa efectora de una respuesta inmunológica, al contrario que las etapas cognitiva y de activación

de una respuesta inmunológica. Entre las células inmunitarias ejemplares se incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (por ejemplo células B y células T, incluyendo células T citolíticas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleaeres, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En formas de realización preferentes, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos y los macrófagos que expresan FcR participan en la eliminación específica de células diana y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunológico, o la unión a células que presentan antígenos. En otras formas de realización, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, o una célula o microorganismos diana. La expresión de un FcR particular sobre una célula efectora puede estar regulada por factores humorales tales como las citocinas. Por ejemplo, la expresión de Fc-gammaRI se ha encontrado que resulta regulada positivamente por el interferón gamma (IFN-γ). Esta expresión potenciada incrementa la actividad citotóxica de las células que portan Fc-gammaRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

La expresión "célula diana" se refiere a cualquier célula no deseable en un sujeto (por ejemplo un ser humano o animal) que puede ser la diana de un anticuerpo de la enseñanza. En formas de realización preferentes, la célula diana es una célula que expresa o sobreexpresa CLDN6 y que se caracteriza por la asociación de CLDN6 a su superficie celular. Entre las células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular se incluyen las células tumorales.

II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente enseñanza proporciona un anticuerpo anti-CLDN6 conjugado con una fracción o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo un inmunosupresor) o un isótopo radioactivo. Dichos conjugados se denominan en la presente memoria "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que resulte perjudicial y, en particular, elimine células. Entre los ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina B, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina, y análogos y homólogos de los mismos.

Entre los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la enseñanza se incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo-decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejeplo 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 forma de realización preferente, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra forma de realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En todavía otra forma de realización, el agente terapéutico es GM-CSF. En una forma de realización preferente, el agente terapéutico es doxorrubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los anticuerpos de la presente enseñanza también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo, por ejemplo ydoo-131, itrio-90 o indio-111, con el fin de generar radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CLDN6, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpo de la enseñanza pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción farmacológica no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína o polipéptido que presenta una actividad biológica deseada. Entre dichas proteínas puede incluirse, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón-γ, o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica a anticuerpos son bien conocidas; ver, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (editores), páginas 243 a 256 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al, "Antibodies For Drug Delivery", en: Controlled Drug Delivery (2a ed.), Robinson *et al.* (editores), páginas 623 a 653 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (editores), páginas 475 a 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (editores), páginas 303 a 316 (Academic Press, 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol.

Rev. 62:119-58, 1982.

En una forma de realización adicional, los anticuerpos según la enseñanza se unen a un conector-quelante, por ejemplo tiuxetán, que permite que el anticuerpo se conjugue con un isótopo radioactivo.

III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente enseñanza proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos de la presente enseñanza. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos según técnicas convencionales, tales como las dadas a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19º edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En una forma de realización, entre las composiciones se incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo dos o más) anticuerpos aislados de la enseñanza que actúan mediante mecanismos diferentes, por ejemplo un anticuerpo que actúa predominantemente mediante la inducción de CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente mediante la inducción de apoptosis.

Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente enseñanza con por lo menos un agente antiinflamatorio o por lo menos un agente inmunosupresor. En una forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un NSAID (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Entre los agentes preferentes se incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), NSAID tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenac (Voltaren), piroxicam (Feldene), quetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro) e indometacina (Indocin).

En otra forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen agentes que conducen al agotamiento o inactivación funcional de las células T reguladoras, tales como la ciclofosfamida de dosis baja, los anticuerpos anti-CTLA4, o los anticuerpos anti-IL-2 o anti-receptor de IL-2.

En todavía otra forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen uno o más quimioterapéuticos, tales como derivados de Taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorrubicina (adriamicina), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytoxan, Procytox, Neosar). En otra forma de realización, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden administrarse en combinación con agente quimioterapéuticos, que preferentemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que sufren de cáncer, por ejemplo tipos de cáncer tales como los indicados en la presente memoria.

En todavía otra forma de realización, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse conjuntamente con radioterapia y/o células madre periféricas autólogas o trasplante de médula ósea.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, por ejemplo anticuerpo, molécula biespecífica o multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no proporciona ningún efecto toxicológico no deseado (ver, por ejemplo, Berge S.M. *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977).

Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, y fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Entre las sales de adición de base se incluyen los derivados de metales alcalino-térreos, tales como sodio, potasio, magnesio, y calcio, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina y procaína.

Una composición de la presente enseñanza puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia. la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto frente a la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes,

parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son generalmente conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Con el fin de administrar un compuesto de la enseñanza mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto con un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en el sujeto en un portador adecuado, por ejemplo liposomas, o en un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen las soluciones salina y acuosa tamponadora. Entre los liposomas se incluyen emulsiones CGF de agua-en aceite-en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.*, J. Neuroimmunol. 7:27, 1984).

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido de la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones farmacéuticas de la enseñanza. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez correcta puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes indicados anteriormente, según se requiera, seguido de la microfiltración de esterilización.

Generalmente se preparan dispersiones mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos diferentes de los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), que rinden unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional además de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

Los regímenes de administración se ajustan con el fin de proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma unitaria de administración para facilitar la administración y uniformizar las dosis. La forma de administración unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que deben tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico y sulfito sódico, (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo y alfa-tocoferol, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

Para las composiciones terapéuticas, entre las formulaciones de la presente enseñanza se incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de administración unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos conocidos de la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de administración única variará dependiendo del sujeto bajo tratamiento y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de administración única generalmente será la

cantidad de composición que produce un efecto terapéutico.

Las formulaciones de la presente enseñanza que resultan adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de spray que contienen dichos portadores tal como se conoce de la técnica que resultan apropiados. Entre las formas de administración para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de la presente enseñanza se incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que resulten necesarios.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrados parenteralmente tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, aunque sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal, y la infusión.

Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la enseñanza se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez correcta puede mantenerse mediante, por ejemplo, la utilización de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de surfactantes.

Dichas composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol y ácido fenolsórbico. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares y cloruro sódico, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retardan de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente enseñanza, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza, se formulan en formas de administración farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que resulte tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente enseñanza utilizadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado general de salud e historia médica previa del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la materia podrá determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la enseñanza utilizadas en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de alcanzar el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la enseñanza será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja que produzca un efecto terapéutico. Esta dosis eficaz generalmente dependerá de los factores indicados anteriormente. Resulta preferente que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada proximalmente al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separada a intervalos apropiados durante el día, opcionalmente en formas de administración unitarias. Aunque resulta posible que un compuesto de la presente enseñanza se administre solo, resulta preferible administrar el compuesto en forma de una formulación (composición) farmacéutica.

En una forma de realización, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse mediante infusión, preferentemente una infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración también puede llevarse a cabo mediante infusión continua durante un periodo de entre 2 y 24 horas, tal como de entre 2 y 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según se requiera, por ejemplo tras 6 meses o 12 meses. La dosis puede determinarse o ajustarse mediante la medición de la cantidad de anticuerpos anti-CLDN6 monoclonales circulantes tras la administración

en una muestra biológica mediante la utilización de anticuerpos antiidiotípicos con diana en los anticuerpos anti-CLDN6.

En todavía otra forma de realización, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

En todavía otra forma de realización, los anticuerpos según la enseñanza pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra CLDN6 seguido de una infusión de un anticuerpo contra CLDN6 conjugado con un isótopo radioactivo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, 7 a 9 días después.

En una forma de realización de la enseñanza, los compuestos terapéuticos de la enseñanza se formulan en liposomas. En una forma de realización más preferente, los liposomas incluyen una fracción directora. En una forma de realización todavía más preferente, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran mediante la inyección de un bolo en un sitio proximal al área deseada, por ejemplo el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida en un grado que la jeringabilidad sea sencilla. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

En una forma de realización adicional, pueden formularse anticuerpos de la enseñanza para impedir o reducir su transporte a través de la placenta. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de la técnica, por ejemplo mediante PEGilación de los anticuerpos o mediante la utilización de fragmentos $F(ab')_2$. Pueden hacerse referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C., Zhuo Z., Griffith B., Keenan J., Biological activities of polyethyleneglycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation, J. Immunol. Methods 152:177-190, 1992, y a Landor M., Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74:279-283, 1995.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral puede medirse mediante respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (RC) se define como la ausencia de ninguna evidencia de enfermedad, clínica, radiológica o de otro tipo. Una respuesta parcial (RP) resulta de una reducción del tamaño tumoral agregado superior al 50%. La mediana de tiempo a la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral también puede medirse a partir de su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, dicha propiedad de una composición puede evaluarse mediante el examen de la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento o la apoptosis celular mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral o, de otro modo, mejorar los síntomas en un sujeto. El experto ordinario en la materia podrá determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

La composición debe ser estéril y fluida en el grado en que la composición puede administrarse mediante una jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse mediante, por ejemplo, la utilización de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de particular requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

En el caso de que el compuesto activo se encuentre convenientemente protegido, tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

IV. Usos y métodos

Los anticuerpos (incluyendo inmunoconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados indicados en la presente memoria) de la presente enseñanza presentan numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que incluyen células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse en células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o en sujetos humanos, por ejemplo *in vivo*, para tratar o prevenir una diversidad de trastornos, tales como los indicados en la presente memoria. Entre los sujetos preferentes se incluyen pacientes humanos que presentan trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la eliminación de células enfermas, en particular células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de CLDN6 y/o un patrón

alterado de asociación de CLDN6 son su superficie celular en comparación con las células normales.

Por ejemplo, en una forma de realización, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden utilizarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse comprenden todos los cánceres y entidades tumorales que expresan CLDN6, incluyendo las indicadas en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento indicadas según la enseñanza también pueden utilizarse para la inmunización o vacunación con el fin de prevenir una enfermedad indicada en la presente memoria.

En otra forma de realización, los anticuerpos de la enseñanza pueden utilizarse para detectar niveles de CLDN6 o formas particulares de CLDN6, o niveles de células que contienen CLDN6 sobre su superficie membranal, en donde dichos niveles pueden asociarse a determinadas enfermedades o síntomas de enfermedad tales como los indicados anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos pueden utilizarse para reducir el número o interactuar con la función de, células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular, implicando de esta manera dichas células como importantes mediadores de la enfermedad. Lo anterior puede conseguirse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CLDN6 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CLDN6. Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y CLDN6 se detectan y se comparan en la muestra y en una muestra de control, es decir, una muestra de referencia.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden someterse a ensayo inicialmente para su actividad de unión asociada a los usos terapéuticos o diagnósticos *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden someterse a ensayo utilizando ensayos de citometría de flujo tal como se indica en la presente memoria.

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

En una forma de realización particular, los anticuerpos se utilizan *in vivo* o *in vitro* para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de enfermedades relacionadas con CLDN6. Entre los ejemplos de enfermedades relacionadas con CLDN6 se incluyen, entre otras, cánceres tales como los indicados en la presente memoria.

Tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-CLDN6 de la enseñanza pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico o un agente inmunosupresor, con el fin de reducir la inducción de respuestas inmunitarias contra los anticuerpos de la enseñanza. El anticuerpo puede unirse al agente (en forma de un inmunocomplejo) o puede administrarse separadamente del agente. En este último caso (la administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente, o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo una terapia anticáncer, por ejemplo la radiación. Entre dichos agentes terapéuticos se incluyen, por ejemplo, una terapia anticáncer, por ejemplo la radiación. Entre dichos agentes terapéuticos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los listados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-CLDN6 de la presente enseñanza con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que operan mediante mecanismos diferentes que rinden un efecto citotóxico para las células tumorales. Dicha coadministración puede resolver problemas causados por el desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las convertiría en no reactivos con el anticuerpo.

Las composiciones (por ejemplo anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficos e inmunoconjugados) de la enseñanza pueden presentar sitios de unión del complemento, tales como partes de IgG1, IgG2 o IgG3 o IgM que se unen al complemento, también pueden utilizarse en presencia del complemento. En una forma de realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un agente de unión de la enseñanza y células efectoras apropiadas puede complementarse con la adición del complemento o de suero que contiene el complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la enseñanza puede mejorarse mediante la unión de proteínas de complemento. En otra forma de realización, las células diana recubiertas con las composiciones de la enseñanza también pueden ser lisadas por el complemento. En todavía otra forma de realización, las composiciones de la enseñanza no activan el complemento.

Las composiciones de la enseñanza también pueden administrarse conjuntamente con el complemento. De

acuerdo con lo anterior, dentro del alcance de la enseñanza se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones resultan ventajosas en el aspecto de que el complemento se encuentra situado en estrecha proximidad a los anticuerpos, o a las moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

Alternativamente, los anticuerpos, o moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la enseñanza y el complemento o el suero pueden administrarse por separado. La unión de las composiciones de la presente enseñanza a células diana puede causar la traslocación del complejo de antígeno CLDN6-anticuerpo a las balsas lipídicas de la membrana celular. Dicha traslocación crea una alta densidad de complejos de antígeno-anticuerpo que pueden activar y/o incrementar eficientemente la CDC.

También comprendido dentro del alcance de la presente enseñanza se encuentran kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la enseñanza (por ejemplo anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones para la utilización. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la enseñanza (por ejemplo un anticuerpo que presenta una actividad complementaria).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la enseñanza se les puede administrar adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la enseñanza) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que incrementa o potencia el efecto terapéutico de los anticuerpos de la enseñanza.

En otras formas de realización, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo incrementa o inhibe, la expresión o la actividad de receptores de Fc-gamma o de Fc-alfa mediante, por ejemplo, el tratamiento del sujeto con una citocina. Entre las citocinas preferentes se incluyen el factor estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (FNT). Otros agentes importantes para incrementar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria son β-glucanos que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificados y que son producidos por una diversidad de plantas y microorganismos, por ejemplo bacterias, algas, hongos, levaduras y cereales. También pueden utilizarse fragmentos de los β-glucanos producidos por los organismos. Preferentemente el β-glucano es un polímero de β(1,3)-glucosa, en la que por lo menos algunas de las unidades esqueléticas de glucosa, por ejemplo 3% a 6% de las unidades esqueléticas de glucosa, presenta ramificaciones, tales como ramas β(1,6).

En una forma de realización particular, la enseñanza proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CLDN6 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CLDN6, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo que se une específicamente a CLDN6, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y CLDN6. A continuación, se detecta la formación de un complejo, en la que una diferencia en la formación de complejo entre la muestra y la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno CLDN6 en la muestra.

En todavía otra forma de realización, la enseñanza proporciona un método para detectar la presencia o para cuantificar la cantidad de células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 con su superficie celular *in vivo* o *in vitro*. El método comprende: (i) administrar en un sujeto una composición de la enseñanza conjugada con un marcador detectable, e (ii) exponer el sujeto a unos medios de detección de dicho marcador detectable con el fin de identificar las áreas que contienen células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular.

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

En el caso de que se utilice en métodos tales como los indicados anteriormente, puede proporcionarse un anticuerpo indicado en la presente memoria con un marcaje que funciona: (i) proporcionando una señal detectable, (ii) interactuando con un segundo marcaje para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o segundo marcaje, por ejemplo FRET (transferencia de energía por resonancia fluorescente), (iii) afectando a la movilidad, por ejemplo la movilidad electroforética, según la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporcionando una fracción de captura, por ejemplo de afinidad, anticuerpo/antígeno, o acomplejamiento iónico. Resultan adecuadas como marcajes, estructurales tales como marcajes fluorescentes, marcajes luminiscentes, marcajes cromóforos, marcajes radioisotópicos, marcajes isotópicos, preferentemente marcajes isotópicos estables, marcajes isobáricos, marcajes enzimáticos, marcajes de partículas, en particular marcajes de partículas metálicas, marcajes de partículas magnéticas, marcajes de partículas de polímero, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lectinas, secuencias de marcaje que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos aminoácidos que pueden

detectarse mediante la utilización de agentes de unión, etc. Los marcajes comprende, de una manera no limitativa, sulfato de bario, ácido yocetámico, ácido yopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato sódico, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato sódico y radiodiagnósticos, incluyendo emisores de positrones, tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nucleidos de resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

En todavía otra forma de realización pueden utilizarse inmunoconjugados de la enseñanza para dirigir compuestos (por ejemplo agentes terapéuticos, marcajes, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que presentan CLDN6 asociado a su superficie mediante la unión de dichos compuestos al anticuerpo. De esta manera, la enseñanza proporciona además métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan CLDN6 y que se caracterizan por la asociación de CLDN6 a su superficie celular, tales como células tumorales circulantes.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Las técnicas y métodos utilizados en la presente memoria se describen en la misma o se llevan a cabo de una manera conocida per se y tal como se indica en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Todos los métodos, incluyendo la utilización de kits y reactivos se llevan a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Ejemplo 1: cuantificación de la expresión de CLDN6 en tejidos normales, tejidos cancerosos y líneas celulares utilizando RT-PCR en tiempo real

Se extrajo el ARN celular total a partir de especímenes de tejido congelados y líneas celulares de cáncer utilizando el minikit RNeasy (Qiagen), cebado con un oligonucleótido dT18 y transcrito inversamente con Superscript II (GIBCO/Lifetech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sometió a ensayo la integridad del ADNc obtenido mediante amplificación de transcritos de p53 en una PCR de 30 ciclos. Tras la normalización respecto a HPRT, se cuantificó la expresión de CLDN6 utilizando el cálculo de ΔΔCT.

Se sometieron a ensayo tejidos de tres individuos para cada tipo de tejido normal. Sólo pudieron detectarse cantidades traza de transcritos de CLDN6 en los tejidos normales tras 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedía ligeramente le nivel de corte de expresión fue el de placenta.

En contraste con los tejidos normales, los presentes inventores encontraron un nivel elevado de expresión de CLDN6 en las muestras de cáncer ovárico (adenocarcinomas), cáncer de pulmón (CPCNP, con la frecuencia y niveles de expresión más altos en los adenocarcinomas), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel (carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas), melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello (adenoma pleomórfico maligno), sarcoma (sarcoma sinovial y carcinosarcoma), cáncer de los conductos biliares, cáncer de células renales (carcinoma de células claras y carcinoma papilar), cáncer uterino y líneas celulares de cáncer A2780 (cáncer ovárico), NIH-OVCAR3 (cáncer ovárico), HCT-116 (cáncer de colon), EFO-27 (cáncer ovárico), CPC-N (CPCP), NCI H552 (CPCNP), SNU-1 (cáncer gástrico), KATOIII (cáncer gástrico), YAPC (cáncer pancreático), AGS (cáncer gástrico), FU97 (cáncer gástrico) y MKN7 (cáncer gástrico).

Ejemplo 2: cuantificación de la expresión de CLDN6 en tejidos normales, tejidos cancerosos y líneas celulares utilizando el análisis de transferencia western

Para el análisis de transferencia western, se extrajeron 20 µg de proteínas totales extraídas de células lisadas con tampón de lisis de Laemmli. Los extractos se diluyeron en tampón para muestras reductor (Roth), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron sobre membrana de PVDF (Pall). La inmunotinción se llevó a cabo con anticuerpos policlonales reactivos con CLDN6 (ARP) y beta-actina (Abcam), seguido de la detección de anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios de cabra antiratón y anticonejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako).

Se sometieron a ensayo lisados de tejidos de hasta cinco individuos para cada tipo de tejido normal. No se detectó expresión de proteína CLDN6 en ninguno de los tejidos normales analizados. En contraste con los tejidos normales, se detectó una expresión de nivel elevado de proteína CLDN6 en las muestras de cáncer ovárico y de cáncer de pulmón. Se detectó expresión de CLDN6 en NIH-OVCAR3 (cáncer ovárico), MKN7 (cáncer gástrico), AGS (cáncer gástrico), CPC-N (CPCP), HCT-116 (cáncer de colon), FU97 (cáncer gástrico), NEC8 (carcinoma embrionario testicular), JAR (coriocarcinoma placentario), JEG3 (coriocarcinoma placentario), BEWO (coriocarcinoma placentario) y PA-1 (teratocarcinoma ovárico).

Ejemplo 3: análisis inmunohistoquímico (IHQ) de la expresión de CLDN6 en tejidos normales y tejidos cancerosos

Se incubaron secciones de tejido incluidas en parafina (4 µm), durante 1 hora a 58ºC en una placa calefactora (HI 1220, Leica). Se eliminó la parafina de las secciones mediante incubación de los portaobjetos en Roticlear (Roth) durante 2x10 minutos a TA. Después, se rehidrataron las secciones en una serie alcohólica (99%, 2x96%, 80% y 70%, 5 minutos cada uno). Se llevó a cabo la extracción de los antígenos sometiendo a ebullición de los portaobjetos a 120ºC (15 psi) durante 15 minutos en tampón citrato 10 mM (pH 6,0) + Tween-20 al 0,05%. Directamente después los portaobjetos sometidos a ebullición se incubaron en PBS durante 5 minutos. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3% en MeOH durante 15 minutos a TA. Para evitar la unión no específica, los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 minutos a TA. A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo policlonal específico de CLDN6 (1 µg/ml) (ARP) durante la noche a 4ºC. Al día siguiente los portaobjetos se lavaron con PBS a TA (3x5 minutos) y se incubaron con 100 µl de los anticuerpos secundarios (poli-HRP-IgG anticonejo PowerVision listo para el uso (ImmunoLogic)) durante una hora a TA. Después, los portaobjetos se lavaron con PBS a TA (3x5 minutos). La tinción final se llevó a cabo mediante la utilización del kit de sustrato VECTOR NovaRED SK-4800 de Vector Laboratories (Burlingame). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 90 s a TA. Tras la deshidratación con una serie alcohólica (70%, 80%, 2x96% y 99%, 5 minutos cada uno) y la incubación durante 10 minutos en xilol, los portaobjetos se montaron con el kit X-tra (Medite Histotechnic).

No era detectable expresión de proteína CLDN6 en los tejidos normales de pulmón, ovario, estómago, colon, páncreas, hígado, duodeno o riñón. En contraste con los tejidos normales, se observó una tinción fuerte o por lo menos significativa en secciones de tejido de cáncer ovárico, cáncer de pulmón, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de vejiga urinaria (carcinoma de células transicionales), cáncer cervical, cáncer testicular (seminoma) y cáncer uterino. La tinción resultó claramente acentuada en la membrana plasmática de las poblaciones celulares epiteliales malignas, mientras que las células epiteliales estromales y no malignas contiguas eran negativas. Estos resultados indican que la proteína CLDN6 se localiza en la membrana plasmática de las células malignas.

Ejemplo 4: generación de anticuerpos murinos contra CLDN6

a. Generación de vectores de expresión codificantes de CLDN6 de longitud completa y fragmentos de CLDN6

Se preparó una secuencia de ADN de codones optimizados no natural (SEC ID nº 3) codificante de CLDN6 de longitud completa (número de acceso de NCBI NP_067018.2, SEC ID nº 2), mediante síntesis química (GENEART AG, Alemania) y se clonó en el vector pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen, USA), rindiendo el vector p3953. La inserción de un codón de parada permitió la expresión de proteína CLDN6 sin fusión con la etiqueta myc-His codificada en el vector. La expresión de CLDN6 se sometió a ensayo mediante análisis de transferencia western, citometría de flujo e inmunofluorescencia utilizando anticuerpo anti-CLDN6 disponibles comercialmente (ARP, 01-8865, R&D Systems, MAB3656).

Además, se preparó una secuencia de ADN de codones optimizados (SEC ID nº 4) codificante del fragmento putativo de dominio extracelular 2 (EC2) de CLDN6 (SEC ID nº 6) como fusión con un péptido de señal derivado del líder Ig-kappa N-terminal seguido de 4 aminoácidos adicionales para garantizar un sitio de corte correcto de la peptidasa de señal (SEC ID nº 5) y se clonó en el vector pcDNA3.1/myc-His, rindiendo el vector p3974. Antes de la inmunización, se confirmó la expresión del fragmento EC2 mediante microscopía de inmunofluorescencia en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente y fijadas con paraformaldehído (PFA) utilizando un anticuerpo anti-myc disponible comercialmente (Cell Signaling, MAB 2276).

b. Generación de líneas celulares establemente expresantes de CLDN6

Las líneas celulares HEK293 y P3X63Ag8U.1 establemente expresantes de CLDN6 se generaron mediante técnicas estándares utilizando el vector p3953.

c. Inmunizaciones

Se inmunizaron ratones Balb/c con 25 µg de ADN del plásmido p3974 conjuntamente con 4 µl de PEI-manosa (PEI-Man, jetPEI™-Man *in vivo* de PolyPlus Transfection) (PEI-Man 150 mM en H_2O con 5% de glucosa) mediante inyección intraperitoneal los días 0, 16 y 36. Los días 48 y 62 los ratones se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal con células de mieloma P3X63Ag8U.1 transfectadas con el vector p3953 para expresar establemente CLDN6. Las células administradas el día 62 habían sido irradiadas con 3000 rad antes de la inyección. La presencia de anticuerpos dirigidos contra CLDN6 en sueros de ratones se monitorizaron mediante microscopía de inmunofluorescencia entre los días 20 y 70 utilizando células CHO-K1 cotransfectadas con ácidos nucleicos codificantes de CLDN6 y PFV. Con este fin, 24 h después de la transfección se incubaron células fijadas con PFA o no fijadas, con una dilución 1:100 de sueros de ratones inmunizados durante 45 minutos a temperatura ambiente (TA). Las células se lavaron, se incubaron con un anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) y se sometieron a microscopía de fluorescencia.

Se detectaron los anticuerpos específicos anti-CLDN6 en muestras de suero obtenidas de un ratón a partir de las cuales se produjo el hibridoma F3-6C3-H8; ver la figura 2.

Para la generación de anticuerpos monoclonales, los ratones con respuestas inmunitarias anti-CLDN6 detectables recibieron un refuerzo cuatro días antes de la esplenectomía mediante inyección intraperitoneal de $2x10^7$ células HEK293 transfectadas establemente con vector p3953.

d. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales murinos contra CLDN6

Se fusionaron $6x10^7$ esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con $3x10^7$ células de la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL 1580) utilizando PEG 1500 (Roche, CRL nº 10783641001). Se sembraron las células a razón de aproximadamente $5x10^4$ células en cada pocillo de placas de microtitulación de fondo plano y se cultivaron durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo RPMI que contenía suero de feto bovino al 10% inactivado por calor, complemento de fusión de hibridoma y de clonación al 1% (HFCS, Roche, CRL nº 11363735), HEPES 10 mM, piruvato sódico 1 mM, glucosa al 4,5%, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, 1 x penicilina/estreptomicina y complemento 1xHAT (Invitrogen, CRL 21060). Tras 10 a 14 días, se cribaron los pocillos individuales mediante citometría de flujo para los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Los hibridomas secretores de anticuerpos se subclonaron mediante dilución limitante y se sometieron a ensayo nuevamente para los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6. Los subclones estables se cultivaron para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para la caracterización. Se seleccionó por lo menos un clon de cada hibridoma que conservaba la reactividad de las células parentales (analizada mediante citometría de flujo). Se generaron bancos celulares de nueve viales para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Ejemplo 5: características de unión de sobrenadantes de hibridoma y anticuerpos monoclonales

a. Control de calidad de células HEK293T transfectadas transitoriamente mediante análisis de (i) transferencia western e (ii) citometría de flujo

(i) Se transfectaron células HEK293T con ácidos nucleicos codificantes de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, o se transfectaron simuladamente. Se determinó la expresión de CLDN3, CLDN4, CLDN6 o CLDN9 en células HEK293T mediante transferencia western. Con este fin, se recolectaron las células 24 horas después de la transfección y se sometieron a lisis. El lisado se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se tiñó con anticuerpos anti-CLDN3(A) (Invitrogen, 34 1700), anti-CLDN4(A) (Zymed, 32 9400), anti-CDLN6(A) (ARP, 01-8865) o anti-CLDN9(A) (Santa Cruz, sc-17672) que se unen específicamente al extremo C-terminal de la claudina correspondiente bajo condiciones desnaturalizantes. Tras la incubación con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y el revelado con reactivo ECL, se utilizó para la visualización un instrumento LAS-3000 imager (Fuji). Las bandas de los pesos moleculares esperados de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente, se observaron sólo en las células transfectadas pero no en las células de control (figura 3), demostrando que las células HEK293T no expresan endógenamente ninguna de las claudinas investigadas y, de esta manera, son una herramienta adecuada para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos de CLDN6.

(ii) Las células HEK293T de (i) se analizaron adicionalmente mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CLDN que reconocían epítopos nativos (IgG2a de ratón anti-CLDN3 (R&D, MAB4620), IgG2a de ratón anti-CLDN4 (R&D, MAB4219), IgG2b de ratón anti-CLDN6 (R&D, MAB3656). Los anticuerpos obtenibles de Sigma bajo los números de producto M9144 y M8894 sirvieron como controles de isotipo. La especificidad de dichos anticuerpos anti-CLDN se analizó utilizando células HEK293T transfectadas transitoriamente con ácidos nucleicos codificantes de CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9, respectivamente. El anticuerpo anti-CLDN6 muestra reactividad cruzada con CLDN3, CLDN4 y CLDN9. El anticuerpo anti-CLDN4 mostraba reactividad cruzada con CLDN3, CLDN6 y CLDN9. El anticuerpo anti-CLDN3 se unía específicamente a CLDN3 (figura 4).

b. Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos utilizando la citometría de flujo

Se cotransfectaron células HEK293T con un vector codificante de diferentes proteínas CLDN y un vector codificante de un marcador de fluorescencia. Se recolectaron células 24 h después de la transfección, utilizando solución de tripsina al 0,05%/EDTA y se lavaron con tampón FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%). Las células se transfirieron a placas de microtitulación de fondo en U a razón de $2x10^5$ células en cada pocillo y se incubaron durante 60 minutos a 4ºC con sobrenadantes de hibridoma. Tras el lavado tres veces con tampón de FACS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG1+2a+2b+3 de ratón conjugado con APC (Dianova, 115-135-164). A continuación, las células se lavaron dos veces y se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un FACSArray de BD (figura 5). Se representa la expresión del marcador de fluorescencia en el eje horizontal frente a la unión del anticuerpo en el eje vertical. Un anticuerpo IgG2b de ratón anti-CLDN6 disponible comercialmente (R&D, MAB3656) sirvió de control positivo y el anticuerpo obtenible de Sigma bajo el número de producto M8894 sirvió de control de isotipo.

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

Ejemplo 6: generación y ensayo de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

a. Generación de vectores de expresión codificantes del dominio extracelular 1 de CLDN6

Se preparó una secuencia de ADN de codones optimizados (SEC ID nº 12) codificante del fragmento putativo del dominio extracelular 1 (DE1) de CLDN6 (SEC ID nº 7) en forma de una fusión con un péptido de señal derivado del líder N-terminal de Ig kappa seguido de 4 aminoácidos adicionales para garantizar un sitio correcto de corte de la peptidasa de señal (SEC ID nº 13), y se clonó en el vector pcDNA3.1/myc His, rindiendo el vector p3973. Antes de la inmunización se confirmó la expresión del fragmento DE1 mediante microscopía de inmunofluorescencia en células CHO-K1 transfectadas transitoriamente y fijadas con paraformaldehído (PFA) utilizando un anticuerpo anti-myc disponible comercialmente (Cell Signaling, MAB 2276).

b. Inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/c con 25 µg de ADN del plásmido p3973 conjuntamente con 4 µl de PEI-manosa (PEI-Man, jetPEI™-Man *in vivo* de PolyPlus Transfection) (PEI Man 150 mM en H_2O con glucosa al 5%) mediante inyección intraperitoneal los días 0 y 14. Los días 28 y 44 se inmunizaron ratones por vía subcutánea con los péptidos conjugados con KLH SEC ID nº 14 y SEC ID nº 15 (100 µg cada uno en PBS, JPT Peptide Technologies GmbH, Alemania) conjuntamente con PTO-CpG-ODN purificado mediante HPLC (25 µg en PBS; 5'-TCCATGACGTTCCTGACGTT, Eurofins MWG Operon, Alemania). Los días 64, 77 y 99, se inmunizaron los ratones mediante inyección intraperitoneal con $2x10^7$ células de mieloma P3X63Ag8U.1 transfectadas con vector p3953 para expresar establemente CLDN6. Antes de la administración, las células se trataron con mitomicina-C (2,5 µg/l, Sigma-Aldrich, M4287). Los días 64 y 97 se administraron las células conjuntamente con PTO-CpG-ODN purificado mediante HPLC (50 µg en PBS) el día 77 conjuntamente con adyuvante incompleto de Freund.

Para la generación de anticuerpos monoclonales, los ratones con respuestas inmunitarias anti-CLDN6 detectables recibieron un refuerzo cuatro días antes de la esplenectomía mediante inyección intraperitoneal de $2x10^7$ células HEK293 transfectadas establemente con vector p3953.

c. Ensayo de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Citometría de flujo

Para someter a ensayo la unión de los anticuerpos monoclonales a CLDN6 y sus homólogos, se transfectaron transitoriamente células HEK293T con el plásmido codificante de claudina correspondiente y se analizó la expresión mediante citometría de flujo. Con el fin de diferenciar entre células transfectadas y no transfectadas, se cotransfectaron células HEK293T con un marcador de fluorescencia como informador. Las células 24 h después de la transfección se recolectaron con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón de FACS a una densidad de $2x10^6$ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con el anticuerpo apropiado a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 4ºC. Se utilizó un anticuerpo de reactividad cruzada para detectar la expresión de CLDN6 y CLDN9. Los anticuerpos de ratón anti-claudina disponibles comercialmente anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) y anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) sirvieron de controles positivos, mientras que IgG2a (Sigma, M9144) e IgG2b (Sigma, M8894) de ratón, respectivamente, sirvieron de controles de isotipo. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG1+2a+2b+3a de ratón conjugado con APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. Se analizó la unión mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSArray de BD. La expresión del marcador de fluorescencia se representó en el eje horizontal frente a la unión del anticuerpo en el eje vertical.

CDC

Se determinó la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la medición del contenido de ATP intracelular en las células no lisadas tras la adición del complemento humano a las células diana incubadas con anticuerpos anti-CLDN6. Como método analítico muy sensible, se utilizó la reacción luminiscente de la luciferasa para medir el ATP.

Se recolectaron las células CHO-K1 transfectadas establemente con CLDN6 (CHO-K1-CLDN6) con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron dos veces con medio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) y se suspendieron a una densidad de $1x10^7$ células/ml en medio X-Vivo 15. Se transfirieron 250 µl de la suspensión celular en una cubeta de electroporación de 0,4 cm y se mezclaron con 7 µg de ARN transcrito *in vitro* codificante de luciferasa (ARN de luciferasa IVT). Las células se electroporaron a 200 V y 300 µF utilizando un instrumento Gene Pulser Xcell (Bio Rad). Tras la electroporación, las células se suspendieron en 2,4 ml de D-MEM/F12 precalentado (1:1) con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 31331-093) que contenía FCS al 10% (v/v), penicilina/estreptomicina al 1% (v/v) y 1,5 mg/ml de G418. Se sembraron 50 µl de la suspensión celular en cada pocillo en una placa de PP de 96 pocillos y se incubaron a 37ºC y con 7,5% de CO_2. Veinticuatro horas después de la electroporación se añadieron a las células 50 µl de anticuerpos murinos monoclonales anti-CLDN6 en 60% de RPMI (que contenía HEPES 20 mM) y 40 % de suero humano (pool sérico obtenido de seis donantes sanos) a las concentraciones indicadas. Se añadieron 10 µl de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS en cada pocillo a los controles de lisis total, mientras que se añadieron 10 µl de PBS a cada pocillo a los controles de células max. viables y a las muestras mismas. Tras incubar durante 80 minutos a 37ºC y con 7,5% de CO_2, se añadieron a cada pocillo 50 µl de mezcla de luciferina (3,84 mg/ml de D-luciferina 0,64 U/ml de ATPasa y HEPES 160 mM en ddH_2O). La placa se incubó en la oscuridad durante 45 minutos a TA. Se midió la luminiscencia utilizando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se proporcionan como unidades de luz relativa digitales integradas (URL).

Se electroporaron células NEC8 a 200 V y 400 µF y se cultivaron en RPMI 1640 con medio GlutaMAX-I (Invitrogen, 61870) que contenía FCS al 10% (v/v).

Se calculó la lisis específica como:

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

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

Tratamiento precoz

Para los tratamientos precoces con anticuerpos, se inocularon por vía subcutánea $2x10^7$ células NEC8 en 200 µl de PBSS en el flanco de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Cada grupo experimental consistía de diez ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad. Tres días después de la inoculación se aplicaron 200 µg de los anticuerpos monoclonales murinos purificados muMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A durante 46 días mediante el alternado de inyecciones intravenosas e intraperitoneales dos veces a la semana. Los grupos experimentales tratados con PBS sirvieron como controles negativos. Se monitorizó quincenalmente el volumen tumoral (VT=(longitud x anchura^2)/2). El VT se expresa en mm^3, permitiendo la construcción de curvas de crecimiento tumoral durante el tiempo. Al alcanzar el tumor un volumen superior a 1.500 mm^3 se sacrificaron los ratones.

d. Resultados

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

Los anticuerpos MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 200 a 500 ng/ml) y se alcanzó la saturación de unión a concentraciones bajas (figura 7).

Los anticuerpos MuMAB 59A, 60A, 61D, 64A, 65A, 66B y 67A mostraron una actividad de CDC dependiente de la dosis e indujeron CDC a concentraciones bajas (figura 8). Los anticuerpos anti-CLDN6 muMAB 65A y 66B indujeron CDC sobre las células NEC8 de una manera dependiente de la dosis (figura 9). Se demostró la especificidad de diana de muMAB 65A y 66B mediante la utilización de células NEC8 LVTS2 54 (con inactivación de CLDN6):

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

Ejemplo 7: generación y ensayo de anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLDN6

a. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/humanos

Para la quimerización, se amplificación mediante PCR las regiones variables de las cadenas pesada y ligera murinas, incluyendo las secuencias líder, utilizando los cebadores listados en la tabla, posteriormente. Las cadenas

pesadas murinas se fusionaron con un sitio de restricción ApaI (5'-GGGCCC-3') a la parte N-terminal de la cadena de Fcgamma1 humana, que estaba codificada en el vector de expresión. Se clonaron los dominios variables de la cadena kappa murina que incluía las secuencias líder frente a la región constante utilizando un sitio de restricción BsiWI. La orientación correcta de la región constante en el vector, es decir, adecuada para el promotor precedente del vector, se verificó mediante secuenciación. Debido a la posición del sitio de restricción ApaI, cualquier amplificación de una región variable que incluye la secuencia líder con este propósito debe incluir los primeros 11 nucleótidos de la secuencia de la región constante de gamma-1 humana además de la secuencia del sitio ApaI. La secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena pesada de gamma-1 humana se lista como SEC ID nº 24, la secuencia de aminoácidos de la región constante de gamma-1 humana expresada de esta manera se lista como SEC ID nº 25. La secuencia de nucleótidos codificante de la parte constante de la cadena ligera kappa se lista como SEC ID nº 26; la secuencia de aminoácidos correspondiente se lista como SEC ID nº 27.

Tabla 1: líneas celulares de hibridoma de ratón utilizadas para la clonación de anticuerpos

	muMAB	Isotipo	SEC ID nº de cebadores
cadena pesada	64A	IgG2a	17, 18
	89A	IgG2a	17, 19
	61D	IgG2a	17, 20
	67A	IgG2a	17, 20
cadena ligera	64A	IgK	21, 22
	89A	IgK	21, 23
	61D	IgK	21, 22
	67A	IgK	21, 22

Correspondientemente a sus contrapartidas murinas, los anticuerpos monoclonales quiméricos se denominaron añadiendo el prefijo "quim", por ejemplo quimAB 64A.

La amplificación de las regiones variables murinas de las cadenas ligera y pesada que incluían las secuencias líder se llevó a cabo siguiendo el método de "PCR step-out" descrito en Matz *et al.* (Nucleic Acids Research 22(6), 1999). Para ello, se preparó el ARN total a partir de las líneas celulares de hibridoma monoclonal (ver la tabla 1) mediante métodos estándares conocidos por el experto en la materia, por ejemplo con la utilización del MiniKit RNeasy (Qiagen). Se preparó ADNc de cadena sencilla siguiendo el método de "cambio de molde" también descrito en Matz *et al.* (Nucleic Acids Research 27(6):1558, 1999). Además de un oligómero (dT)30 (SEC ID nº 28), incluía un oligómero híbrido de ADN/ARN (SEC ID nº 29) que servía como adaptador 5' para el cambio de molde durante la polimerización de la cadena de ADNc. En este oligómero adaptador, los últimos tres nucleótidos eran ribonucleótidos y no desoxirribonucleótidos. El método posterior de "PCR step-out" utilizó un oligómero antisentido con diana en la región constante de la cadena kappa de ratón o en la región constante de la subclase 2a de la cadena gamma (SEC ID nº 30 y nº 31, respectivamente). La subclase IgG del anticuerpo monoclonal murino producido por las líneas celulares de hibridoma previamente se había analizado inmunológicamente utilizando IsoStrip (Roche) y se seleccionó el oligómero antisentido apropiado correspondiente (ver la tabla 1). Una mezcla de cebadores sirvió como oligómero de sentido en la "PCR step-out", comprendiendo los dos oligómeros listados en SEC ID nº 32 y nº 33.

Las regiones variables murinas identificadas, incluyendo las secuencias líder seguidamente se amplificaron por PCR omitiendo la 5'-UTR y la región constante de ratón 3', añadiendo sitios de restricción a los extremos que permitiesen la subclonación en los vectores de expresión preparados que portaban las regiones constantes humanas. Además, los oligómeros de sentido proporcionaron una secuencia de Kozak de consenso (5'-GCCGCCACC-3') y los oligómeros antisentido para las regiones variables de cadena pesada incluían los primeros 11 nucleótidos de la región constante de la gamma-1 humana además del sitio de restricción ApaI (ver la tabla 1, SEC ID nº 17 a nº 23). Las regiones variables de cadena ligera kappa, que incluían las secuencias líder, se clonaron utilizando los enzimas de restricción HindIII y BsiWI; las regiones variables de cadena pesada gamma requirieron los enzimas de restricción HindIII y ApaI.

Se amplificaron regiones variables murinas adicionales y cadenas pesadas que incluían secuencias líder y se generaron anticuerpos monoclonales quiméricos adicionales contra CLDN6 según el protocolo dado a conocer anteriormente.

b. <u>Producción de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6</u>

Se expresaron transitoriamente anticuerpos monoclonales quiméricos en células HEK293T (ATCC nº CRL-11268) transfectadas con ADN plasmídico codificante de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo correspondiente. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron $8x10^7$ células en placas de cultivo celular de 145 mm y se cultivaron en 25 ml de medio HEK293T (DMEM/F12 + GlutaMAX-I, FCS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%). Se disolvieron 20 µg de ADN plasmídico en 5 ml de medio HEK293T sin complementos por cada placa de cultivo celular. Tras añadir 75 µl de polietilenimina lineal (PEI) (1 mg/ml) (Polyscience, 23966), se incubó la mezcla

(ADN:PEI) durante 15 minutos a TA. A continuación, la mezcla de transfección se añadió gota a gota a las células. Veinticuatro horas después de la transfección se sustituyó el medio de HEK293T por medio Pro293a (Lonza, BE12-764Q) que contenía penicilina/estreptomicina al 1%. Para la expresión óptima, las células transfectadas se cultivaron a 37ºC y con 7,5% de CO_2 durante 96 a 120 h adicionales. Se recolectó el sobrenadante y el anticuerpo quimérico se purificó mediante FPLC utilizando columnas de proteína A. Se determinó la concentración del anticuerpo y la calidad se sometió a ensayo mediante SDS-PAGE.

c. Ensayo de anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLDN6

Citometría de flujo

Para someter a ensayo las especificidades y afinidades de los anticuerpos monoclonales quiméricos específicos de CLDN6 que se unían a las células HEK293 transfectadas establemente con CLDN3, 4, 6 o 9, respectivamente, y de líneas celulares tumorales que expresaban endógenamente CLDN6, se realizaron análisis de citometría de flujo. Por lo tanto, se recolectaron las células con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón de FACS a una densidad de $2x10^6$ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con el anticuerpo apropiado a las concentraciones indicadas durante 60 minutos a 4ºC. Se utilizó un anticuerpo con reactividad cruzada quimérico (quimAB 5F2D2) para detectar la expresión de CLDN6 y CLDN9. Los anticuerpos de ratón anticlaudina disponibles comercialmente anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) y anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) sirvieron de controles positivos, mientras que la IgG1-kappa humana (Sigma, I5154) sirvió de control negativo. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron durante 30 minutos a 4ºC con un anticuerpo secundario específico Fc-gamma de cabra anti-IgG humana conjugado con APC (Dianova, 109-136-170) o anti-IgG de ratón 1+2a+2b+3a conjugado con APC (Dianova, 115-135-164), respectivamente. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. Se analizó la unión mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSArray de BD.

CDC

Se determinó la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la medición del contenido de ATP intracelular en células no lisadas tras la adición de complemento humano a las células diana incubadas con anticuerpos anti-CLDN6. Debido a que es un método analítico muy sensible, se utilizó la reacción bioluminiscente de la luciferasa para medir el ATP.

En dicho ensayo, se utilizaron células de tipo salvaje NEC8 (positivas para CLDN6) y células NEC8 inactivadas para CLDN6 (CLDN6-negativas), ambas transducidas establemente con constructo de expresión de luciferasa. Las células se recolectaron con tripsina al 0,05%/EDTA y se ajustaron a una densidad de $2x10^5$ células/ml en RPMI con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) que contenía FCS al 10% (v/v). Se sembraron $1x10^4$ células en una placa de PP de 96 pocillos blanca y se incubaron durante 24 h a 37ºC y con 5% de CO_2. Tras la incubación, se añadieron 50 µl de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en 60% de RPMI (que contenía HEPES 20 mM) y 40% de suero humano (pool sérico obtenido de seis donantes sanos) a las células a las concentraciones indicadas. Se añadieron 10 µl de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS en cada pocillo a los controles de lisis total, mientras que se añadieron 10 µl de PBS a cada pocillo a controles de células max. viables y a las muestras mismas. Tras una incubación adicional de 80 minutos a 37ºC y con 5% de CO_2, se añadieron a cada pocillo 50 µl de mezcla de luciferina (3,84 mg/ml de D-luciferina, 0,64 U/ml de ATPasa y HEPES 160 mM en ddH_2O). La placa se incubó en la oscuridad a TA durante 45 minutos. Se midió la bioluminiscencia utilizando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se proporcionan como unidades lumínicas relativas (ULR) digitales integradas.

Se calculó la lisis específica como:

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

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

ADCC

Se determinó la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante la medición del contenido de ATP intracelular en células no lisadas tras la adición de PBMC humanas a las células diana incubadas con anticuerpos anti-CLDN6. Como método analítico muy sensible, se utilizó la reacción bioluminiscente de la luciferasa para medir el ATP.

En dicho ensayo, se utilizaron células NEC-8 de tipo salvaje (CLDN6-positivas) y células NEC-8 con inactivación de CLDN6 (CLDN6-negativas) que habían sido transducidas establemente con constructo de expresión de

luciferasa. Las células se recolectaron con tripsina al 0,05%/EDTA para ajustarlas a una densidad de $2x10^5$ células/ml en RPMI con medio GlutaMax-I (Invitrogen, 61870-010) que contenía FCS al 10% (v/v) y Hepes 20 mM. Se sembraron $1x10^4$ células en una placa de PP de 96 pocillos blanca y se incubaron durante 4 h a 37ºC y con 5% de CO_2. Se aislaron las PBMC a partir de muestras de sangre de donante humano mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Hypaque (GE Healthcare, nº 17144003). Se aisló la interfase que contenía PBMC y se lavaron las células con PBS/EDTA (2 mM). Se sembraron $1x10^8$ PBMC en 50 ml de medio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) que contenía suero humano al 5% inactivado por calor (Lonza, US14-402E) y se incubaron durante 2 h a 37ºC y con 5% de CO_2.

Cuatro horas después de la siembra de las células diana (NEC-8), se añadieron 25 µl de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en PBS a las células a las concentraciones indicadas. Las PBMC no adherentes, que se habían separado en 2 h de incubación de los monocitos adherentes, se recolectaron y se ajustaron a $8x10^6$ células/ml en medio X-vivo 15. Se añadieron 25 µl de dicha suspensión celular a las células diana y los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6. Se incubaron las placas durante 24 h a 37ºC y con 5% de CO_2.

Tras la incubación de 24 h, se añadieron 10 µl de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS en cada pocillo a los controles de lisis total, mientras que se añadieron 10 µl de PBS a cada pocillo a los controles de células max. viables y a las muestras mismas. Se añadieron 50 µl de mezcla de luciferina (D-luciferina 3,84 mg/ml, ATPasa 0,64 U/ml y HEPES 160 mM en ddH_2O) a cada pocillo. La placa se incubó en la oscuridad a TA durante 30 minutos. SE midió la bioluminiscencia utilizando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Se proporcionan los resultados como unidades lumínicas relativas (ULR) digitales integradas.

La lisis específica se calcula como:

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

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

d. Resultados

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron una unión fuerte a CLDN6 humano, mientras que no se observó unión a CLDN3, 4 y 9.

Con respecto a la unión a CLDN6 humano expresado establemente sobre la superficie de las células HEK293, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 450 a 600 ng/ml) y se alcanzó la saturación de la unión a concentraciones bajas. QuimAB 67A y 61D mostraron valores de EC50 bajos (EC50: 1.000 ng/ml) e intermedios (EC50: 2.300 ng/ml), respectivamente (figura 12).

Con respecto a la unión a CLDN6 expresado endógenamente en células NEC8, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 600 a 650 ng/ml) y se alcanzó la saturación de la unión a concentraciones bajas, mientras que quimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 intermedios (EC50: 1.700 ng/ml) y altos (EC50: 6.100 ng/ml), respectivamente (figura 13).

Con respecto a la unión a CLDN6 expresado endógenamente en células OV90, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A y 89A mostraron valores de EC50 muy bajos (EC50: 550 a 600 ng/ml) y se alcanzó la saturación de la unión a concentraciones bajas. QuimAB 61D y 67A mostraron valores de EC50 intermedios (EC50: 1.500 ng/ml y EC50: 2.300 ng/ml, respectivamente) (figura 14).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis sobre las células NEC-8 (figura 15).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 61D, 64A, 67A y 89A mostraron una actividad de ADCC dependiente de la dosis sobre las células NEC-8 e indujeron ADCC incluso a concentraciones de anticuerpo bajas (figura 16).

Dichos resultados demuestran claramente la especificidad de dichos anticuerpos monoclonales quiméricos para CLDN6.

Ejemplo 8: tratamiento utilizando anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Tratamiento precoz

Para los tratamientos precoces de anticuerpos, se inocularon por vía subcutánea $2x10^7$ células NEC8 en 200 µl de medio RPMI (Gibco) en el flanco de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos. Cada grupo experimental consistía de diez ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad. Tres días después de la inoculación de células tumorales se aplicaron 200 µg de anticuerpo monoclonal murino purificado muMAB 89A durante siete semanas mediante el alternado de inyecciones intravenosa e intraperitoneal dos veces a la semana. El grupo experimental tratado con PBS sirvió de control negativo. Se monitorizó quincenalmente el volumen tumoral (VT=(longitud x anchura^2)/2). El VT se expresó en mm^3, permitiendo la construcción de curvas de crecimiento tumoral durante el tiempo. Al alcanzar el tumor un volumen superior a 1.500 mm^3 se sacrificaron los ratones.

Tratamientos avanzados

Para los tratamientos de anticuerpos de los tumores de xenoinjerto avanzados, se inocularon por vía subcutánea $2x10^7$ células NEC8 en 200 µl de medio RPMI (Gibco) en el flanco de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos hembra de 6 a 8 semanas. Se monitorizó quincenalmente el volumen tumoral (VT=(longitud x anchura^2)/2). Se expresó el VT en mm^3, permitiendo la construcción de curvas de crecimiento tumoral durante el tiempo. Quince a 17 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones fueron divididos en grupos de tratamiento de ocho animales por cohorte con tamaños tumorales homogéneos superiores a 80 mm^3. Se aplicaron 200 µg de los anticuerpos monoclonales murinos purificados muMAB 61D, 64A, 67A y 89A durante cinco semanas alternando inyecciones intravenosa e intraperitoneal dos veces a la semana. Los grupos experimentales tratados con PBS y un anticuerpo no específico sirvieron de controles negativos. Al alcanzar el tumor un volumen superior a 1.500 mm^3 se sacrificaron los ratones.

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz con ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, los ratones tratados con los anticuerpos monoclonales murinos muMAB 61D, 64A y 67A no mostraron ningún crecimiento tumoral ni siquiera tras detener la inmunoterapia (figura 17).

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

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

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado con ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8, muMAB 64A mostró una supervivencia prolongada (figura 20).

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

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

En un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado con ratones injertados con la NEC8 de tipo salvaje y células NEC8 con una inactivación de CLDN6 estable, sólo muMAB 64A y 89A mostraron un efecto terapéutico en ratones injertados con NEC8 de tipo salvaje, pero no en ratones injertados con células NEC8 con inactivación de CLDN6, demostrando la especificidad para CLDN6 del anticuerpo *in vivo* (figura 23).

Ejemplo 9: mapeado de epítopos de alta resolución de anticuerpos monoclonales contra CLDN6

Los anticuerpos monoclonales específicos de CLDN6 sólo muestran una unión muy débil (si alguna) a los péptidos lineales en los estudios de mapeado de epítopos mediante ELISA, lo que implica que sus epítopos son conformacionales. Con el fin de analizar la interacción entre los anticuerpos indicados en la presente memoria y CLDN6 en su conformación natural, se utilizó la mutagénesis dirigida sitio en cultivo de células de mamífero como técnica de mapeado de epítopos. Se llevó a cabo la mutagénesis por escaneo de alaninas de los aminoácidos 27 a 81 y 137 a 161 en el primer y segundo dominios extracelulares, respectivamente. Tras la expresión transitoria en células HEK293T, se evaluaron los mutantes de CLDN6 para su capacidad de unirse a los anticuerpos monoclonales específicos. La unión alterada de un anticuerpo monoclonal específico a un mutante de CLDN6 sugiere que el aminoácido mutado es un residuo de contacto y/o conformacional importante. Se analizó la unión mediante citometría de flujo. Con el fin de discriminar entre las poblaciones celulares transfectadas y no transfectadas, se cotransfectaron las células con un marcador de fluorescencia.

Los residuos aminoácidos de CLDN6 que son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6 han sido identificados sistemáticamente mediante escaneo de alaninas. Se generaron

mutaciones en la alanina y la glicina mediante mutagénesis dirigida a sitio (GENEART AG, Alemania). Para someter a ensayo la unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos a CLDN6 de tipo salvaje y sus mutantes, se transfectaron transitoriamente células HEK293T con el plásmido codificante de claudina correspondiente y se analizó la expresión mediante citometría de flujo. Con el fin de diferenciar entre las células transfectadas y no transfectadas, las células HEK293T se cotransfectaron con un marcador de fluorescencia como informador. Se recolectaron las células 24 h después de la transfección con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón de FACS a una densidad de $2x10^6$ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con 10 µg/ml de anticuerpo durante 45 minutos a 4ºC. Se utilizó el anticuerpo de ratón anti-CLDN6 disponible comercialmente (R&D, MAB3656) a modo de control para detectar la expresión en superficie celular de los mutantes de CLDN6. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron con un anticuerpo secundario Fc-gamma de cabra anti-IgG humana conjugado con APC (Dianova, 109-136-170) o anti-IgG de ratón 1+2a+2b+3a conjugado con APC (Dianova, 115-135-164) durante 30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. La unión en la población celular transfectada se analizó mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSArray de BD. Por lo tanto, la expresión del marcador de fluorescencia se representó en el eje horizontal frente a la unión de anticuerpo en el eje vertical. La intensidad de señal media de un anticuerpo específico monoclonal quimérico de CLDN6 unido a CLDN6 mutante se expresó como porcentaje de la unión de tipo salvaje. Los aminoácidos que resultan esenciales para la unión no mostraron unión tras mutarse, mientras que los aminoácidos que permitían la unión sólo mostraron una unión reducida en comparación con el tipo salvaje.

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

Ejemplo 10: generación y ensayo de anticuerpos monoclonales mejorados contra CLDN6

Ha resultado que el anticuerpo 64A, aunque es excelente en sus propiedades con respecto a la unión a CLDN6 y la eficacia con respecto al tratamiento tumoral presentaba un residuo de cisteína libre en la posición 46 de la cadena ligera que se ha encontrado que compromete potencialmente sus propiedades de solubilidad, estabilidad y formación de agregados. Dicha cisteína libre también puede no resultar deseable por otros motivos, por ejemplo las disposiciones legales. De esta manera, los presentes inventores crearon anticuerpos basados en 64A, manteniendo sus propiedades deseadas y evitando un residuo de cisteína libre en la posición 46.

Se generó el anticuerpo monoclonal quimérico mAb206-LCC mediante la combinación de la cadena pesada de quimAB 64A con la cadena ligera de quimAB 61D. Se construyeron MAb206-SUBG y mAb206-SUBS mediante sustitución de aminoácidos. Con este fin, la cisteína en la posición 46 dentro de la cadena ligera de quimAB 64A se sustituyó por glicina y serna, respectivamente.

Producción de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en células HEK293T

Se expresaron transitoriamente anticuerpos monoclonales quiméricos en células HEK293T (ATCC nº CRL-11268) transfectadas con ADN plasmídico codificante de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo correspondiente tal como se da a conocer en la sección b del ejemplo 7.

Producción de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en células CHO adaptadas a la suspensión

Se subcultivaron células CHO adaptadas a la suspensión, en medio sin suero en un agitador con CO_2 humidificado. Un día después de la transfección, se sembraron células en el medio sin suero en matraces de agitación. El día de la transfección las células se centrifugaron (5 minutos a 200 x g) y se resuspendieron en medio DMEM fresco (Invitrogen nº 41965-039) en matraces de agitación. Se añadió ADN y reactivo de transfección a las células y se mezclaron suavemente mediante agitación. Tras la incubación estática en un incubador con CO_2, se diluyeron las células con medio de crecimiento sin suero y se cultivaron adicionalmente para la expresión en un agitador de incubación. Las células se alimentaron los días 0, 2, 4 y 6 con CHO CD EfficientFeed™ A y B, respectivamente (Invitrogen nº A1023401 y A1024001). Se recolectaron los anticuerpos quiméricos tras reducirse la viabilidad de las células a un nivel inferior a 90%. Los anticuerpos se purificaron mediante FPLC utilizando columnas con proteína A. Se determinó la concentración de anticuerpo a partir de la absorbancia a 280 nm y se analizó la pureza mediante SDS-PAGE.

Citometría de flujo

La unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos específicos de CLDN6 a las células que expresaban la diana se analizó mediante citometría de flujo. Por lo tanto, se recolectaron las células con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón de FACS a una concentración de $2x10^6$ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con el

anticuerpo apropiado a las concentraciones indicadas durante 30 minutos a 4ºC. Se utilizó quimAB 5F2D2 para detectar la expresión de CLDN6 y CLDN9. Los anticuerpos anticlaudina de ratón disponibles comercialmente anti-CLDN3 (R&D, MAB4620) y anti-CLDN4 (R&D, MAB4219) sirvieron de controles positivos, mientras que IgG1-kappa (Sigma, I5154) sirvió de control negativo. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron durante 30 minutos a 4ºC con un anticuerpo secundario Fc-gamma de cabra anti-IgG humana conjugado con APC (Dianova, nº 109-136-170) o anti-IgG 1+2a+2b+3a de ratón conjugado con APC (Dianova, nº 115-135-164), respectivamente. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. La unión se analizó mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSArray de BD.

CDC

Se determinó la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la medición del contenido de ATP intracelular en células no lisadas tras la adición de complemento humano a las células diana incubadas con anticuerpo anti-CLDN6 tal como se da a conocer en la sección c del ejemplo 7.

ADCC

Se determinó la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediante la medición del contenido de ATP intracelular en células no lisadas tras la adición de PBMC humanas a las células diana incubadas con anticuerpos anti-CLDN6. Como método analítico muy sensible se utilizó la reacción bioluminiscente de la luciferasa para medir el ATP.

En dicho ensayo, se utilizaron células NEC-8 de tipo salvaje (CLDN6-positivas) y células NEC-8 con inactivación de CLDN6 (CLDN6-negativas) transducidas establemente con ARN de luciferasa, mientras que se transfectaron transitoriamente células OV90 con ARN IVT codificante de la luciferasa. Las células se recolectaron con tripsina al 0,05%/EDTA y se ajustaron a una densidad de $2x10^5$ células/ml (NEC-8 de tipo salvaje y con inactivación de CLDN6) o $1x10^6$ células/ml (OV90) en el medio de crecimiento respectivo que contenía además Hepes 20 mM. Se sembraron $1x10^4$ o $5x10^4$ células, respectivamente, en una placa de PP de 96 pocillos blanca y se incubaron a 37ºC y con 5% de CO_2.

Se aislaron las PBMC a partir de muestras de sangre de donante humano mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll Hyplaque (GE Healthcare, nº 17144003). Se aisló la interfase que contenía las PBMC y se lavaron las células dos veces con PBS/EDTA (2 mM). Se sembraron $1x10^8$ PBMC en 50 ml de medio X-Vivo 15 (Lonza, nº BE04-418Q) que contenía 5% de suero humano (pool sérico obtenido de seis donantes sanos) y se incubaron durante 2 h a 37ºC y con 5% de CO_2.

Cuatro horas después de la siembra de las células diana, se añadieron 25 µl de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 en PBS a las células a las concentraciones indicadas. Las PBMC no adherentes, que se separaron en las 2 h de incubación de los monocitos adherentes, se recolectaron y se ajustaron a $1,6x10^7$ células/ml (para los experimentos con NEC-8 de tipo salvaje o con inactivación de CLDN6) o $4x10^7$ células/ml (para el experimento con OV90) en medio X-vivo 15. Se añadieron 25 µl de dicha suspensión celular a las células diana y los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6. Las placas se incubaron durante 24 h a 37ºC y con 5% de CO_2.

Tras las 24 h de incubación, se añadieron 10 µl de Triton X-100 al 8% (v/v) en PBS a cada pocillo a los controles de lisis total, mientras que se añadieron 10 µl de PBS a cada pocillo a los controles de células max. viables y a las muestras mismas. Se añadieron 50 µl de mezcla de luciferina (3,84 mg/ml de D-luciferina, 0,64 U/ml de ATPasa y HEPES 160 mM en ddH_2O) a cada pocillo. La placa se incubó en la oscuridad a TA durante 30 minutos. SE midió la bioluminiscencia utilizando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Se proporcionan los resultados como unidades lumínicas relativas (ULR) digitales integradas.

Se calculó la lisis específica como:

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

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

Tratamientos avanzados

Para los tratamientos de anticuerpos de tumores xenoinjertados avanzados, se inocularon por vía subcutánea $2x10^7$ células NEC8 en 200 µl de medio RPMI (Gibco) en el flanco de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos hembra de 6 a 8 semanas de edad. Se monitorizó quincenalmente el volumen tumoral (VT=(longitud x anchura^2)/2). Se

expresó el VT en mm^3, permitiendo la construcción de curvas de crecimiento tumoral durante el tiempo. Diecisiete días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones fueron divididos en grupos de tratamiento de ocho animales por cohorte con tamaños tumorales homogéneos superiores a 80 mm^3. Se aplicaron 200 µg de los anticuerpos monoclonales quiméricos purificados durante cinco semanas alternando inyecciones intravenosa e intraperitoneal dos veces a la semana. El grupo experimental tratado con un anticuerpo no específico sirvió de control negativo. Al alcanzar el tumor un volumen superior a 1.500 mm^3 se sacrificaron los ratones.

Ensayo de metástasis

Para el ensayo de metástasis, se recolectaron las células NEC8 y se filtraron a través de un filtro celular de 70 µm para excluir los grandes agregados celulares. Se inyectaron $4x10^6$ células NEC8 en la vena de la cola de ratones Nude-Foxn1^{nu} atímicos hembra de 6 semanas de edad. Tres días después de la inyección celular, se aplicaron 200 µg de anticuerpo monoclonal murino purificado muMAB 64A en PBS o PBS sin anticuerpo, dos veces a la semana alternando inyecciones intravenosa e intraperitoneal. Tras 8 semanas, se sacrificaron los ratones, se prepararon los pulmones y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido.

Se aisló el ADN genómico a partir del tejido congelado siguiendo las instrucciones del "Blood & Cell Culture DNA Midi Kit" (Qiagen, nº 13343). Se homogeneizaron los tejidos pulmonares utilizando el instrumento Ultra Torax T8.10 (IKA-Werke). Con el fin de evitar la contaminación con ADN genómico humano, se preparó la PCR cuantitativa (PCRq) del ADN genómico de los pulmones bajo condiciones estériles. Con el fin de evaluar la carga tumoral de células NEC8 humanas en las muestras de tejido pulmonar murino, se generó una curva estándar utilizando una cantidad definida de ADN genómico de NEC8 humanas y de ADN genómico pulmonar murino. Por lo tanto, se utilizó la serie de dilución siguiente (ADN de NEC8 / ADN de pulmón de ratón): 200/0, 40/160, 8/192, 1,6/198,4, 0,32/199,68, 0,064/199,94, 0,013/200 y 0/200 ng. Para la PCRq, se analizaron 200 ng de ADN genómico, 2x verde SYBR (Qiagen, nº 204145), 16 nmoles de cebador de sentido (GGGATAATTTCAGCTGACTAAACAG, Eurofins) y 16 nmoles de cebador antisentido (TTCCGTTTAGTTAGGTGCAGTTATC, Eurofins) en un volumen total de 50 µl, utilizando el sistema de PCR en tiempo real 7300 de Applied Biosystems. A modo de control negativo se utilizó agua en lugar de ADN. Se llevó a cabo la PCRq bajo las condiciones siguientes: 15 minutos a 95ºC (1 rep.), 30 s a 95ºC/30 s a 62ºC/30 s a 72ºC (40 rep.), 15 s a 95ºC/30 s a 60ºC/15 s a 95ºC (1 rep). Todas las reacciones de PCRq se llevaron a cabo por triplicado. La carga tumoral de cada muestra de tejido pulmonar se cuantificó en correlación a la curva estándar utilizando el software del sistema 7300 (Applied Biosystems).

Mapeado de epítopos de alta resolución

Con el fin de analizar la interacción entre los anticuerpos de los presentes inventores y CLDN6 en su conformación natural, los presentes inventores utilizaron la mutagénesis dirigida a sitio en cultivo celular de mamífero como técnica de mapeado de epítopos. Por lo tanto, los presentes inventores llevaron a cabo la mutagénesis de escaneo de alaninas de los aminoácidos 27 a 81 y 137 a 161 en el primer y segundo dominios extracelulares de CLDN6, respectivamente. Se generaron mutaciones en las alaninas mediante mutagénesis dirigida a sitio (GENEART AG, Alemania). Tras la expresión transitoria en células HEK293T, se evaluaron los mutantes de CLDN6 para su capacidad de unirse a los anticuerpos monoclonales específicos. La alteración de la unión de un anticuerpo monoclonal específico a un mutante de CLDN6 sugiere que el aminoácido mutado es un residuo de contacto y/o conformacional importante. La unión se analizó mediante citometría de flujo. Para discriminar entre las poblaciones celulares transfectadas y no transfectadas, las células se cotransfectaron con un marcador de fluorescencia como informador. Veinticuatro horas después de la transfección se recolectaron las células con tripsina al 0,05%/EDTA, se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% y azida sódica al 0,1%) y se resuspendieron en tampón de FACS a una densidad de $2x10^6$ células/ml. Se incubaron 100 µl de la suspensión celular con 10 µg/ml de anticuerpo durante 30 minutos a 4ºC. Se utilizó el anticuerpo anti-CLDN6 de ratón disponible comercialmente (R&D, MAB3656) a modo de control para detectar la expresión en superficie celular de los mutantes de CLDN6. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron con un anticuerpo secundario Fc-gamma de cabra anti-IgG humana conjugado con APC (Dianova, nº 109-136-170) o anti-IgG 1+2a+2b+3a de ratón conjugado con APC (Dianova, nº 115-135-164) durante 30 minutos a 4ºC. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. La unión en poblaciones celulares transfectadas se analizó mediante citometría de flujo utilizando un instrumento FACSArray de BD. Por lo tanto, la expresión del marcador de fluorescencia se representó en el eje horizontal frente a la unión de anticuerpo en el eje vertical. La intensidad de señal media de un anticuerpo monoclonal quimérico específico de CLDN6 unido a CLDN6 mutante se expresó como el porcentaje de la unión de tipo salvaje. Los aminoácidos que resultaron esenciales para la unión no mostraron unión tras mutarse, mientras que los aminoácidos que permitían la unión mostraron una unión definitivamente reducida en comparación con el tipo salvaje.

Inmunohistoquímica

Se fijaron secciones criogénicas de tejido (4 µm) directamente tras realizar las secciones, con acetona durante 10 minutos a -20ºC. A continuación, las secciones se secaron durante 10 minutos a TA y se almacenaron a -80ºC. Antes del uso las secciones se descongelaron (10 minutos a TA) y se rehidrataron en PBS durante 5 minutos. Se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa con peróxido de hidrógeno al 0,3% en PBS durante 15 minutos a

TA. Para evitar la unión no específica, los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 minutos a TA. Después, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal murino específico de CLDN6 muMAB 64A (0,2 µg/ml diluidos en suero de cabra al 10%/PBS) durante la noche a 4ºC. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron con BPS a TA (3x5 minutos) y se incubaron con 100 µl de los anticuerpos secundarios (PowerVision poliHRP-anti-IgG de ratón listo para utilizar (ImmunoLogic)) durante una hora a TA. Después, los portaobjetos se lavaron con PBS a TA (3x5 minutos). La tinción final se llevó a cabo durante 1:30 minutos mediante la utilización del kit de sustrato VECTOR NovaRED SK-4800 de Vector Laboratories (Burlingame). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 90 s a TA. Tras la deshidratación con una serie alcohólica (70%, 80%, 2x96% y 99%, 5 minutos cada uno) y 10 minutos de incubación en xilol, los portaobjetos se montaron con el kit X-tra (Medite Histotechnic).

Con el fin de utilizar los anticuerpos monoclonales quiméricos mAb206-LCC y mAb206-SUBG en tejidos humanos, se marcaron con FITC (Squarix GmbH, Alemania). Se prepararon secciones criogénicas y se trataron tal como se ha indicado anteriormente respecto a la fijación, bloqueo de peroxidasas endógenas y bloqueo de sitio de unión no específica. Después, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos mAb206-LCC-FITC y mAb206-SUBG-FITC (1 µg/ml en suero de cabra al 10%/PBS) durante 1 h a TA en una cámara oscura. Seguidamente los portaobjetos se lavaron con PBS a TA (3x5 minutos) y se incubaron con 200 µl del anticuerpo de conejo anti-FITC-HRP (AbD Serotec, diluido 1:300 en suero de cabra al 10%/PBS) durante 30 minutos a TA. Tras el lavado con PBS a TA (3x5 minutos), la reacción del sustrato se llevó a cabo durante 2:30 minutos mediante la utilización del kit de sustrato VECTOR NovaRED SK-4800 de Vector Laboratories (Burlingame). La contratinción, deshidratación y montaje se llevaron a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

El análisis de la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 mediante citometría de flujo utilizando células HEK293T transfectadas transitoriamente con CLDN6, 3, 4 y 9 humanos, respectivamente, reveló que los anticuerpos monoclonales quiméricos quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraban unión a CLDN6 sin interactuar con CLDN3, 4 y 9, respectivamente (figura 27).

Con respecto a la unión a CLDN6 humano expresado establemente sobre la superficie de células HEK293, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron valores de EC50 bajos similares y se alcanzó la saturación de la unión a concentraciones bajas (figura 28).

Las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAb 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS para las células tumorales que expresan endógenamente CLDN6 humano se evaluó mediante el análisis de la unión a la línea celular de cáncer testicular NEC8 mediante citometría de flujo. En comparación con los anticuerpos específicos de CLDN6 quimAB 64A, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS, la variante de combinación de cadena ligera mAb206-LCC mostró una afinidad de unión tres veces más fuerte para las células NEC8. En todos los casos la saturación de la unión se alcanzó a concentraciones bajas (figura 29).

Un análisis de las afinidades de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS a la línea celular de cáncer ovárico humano OV90 mediante citometría de flujo reveló que los anticuerpos específicos de CLDN6 mostraban valores de EC50 bajos similares. La variante de combinación de cadena ligera mAb206-LCC mostró la unión más fuerte a las células OV90 (figura 30).

En las células NEC-8, los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG mostró actividad de CDC de una manera dependiente de la dosis, mientras que en células NEC-8 con inactivación de CLDN6 ninguno de dichos anticuerpos indujo lisis celular no específica. Este resultado demostró funciones efectoras específicas de diana de quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG (figura 31a).

Los anticuerpos quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron actividad de CDC en las células NEC8 de una manera dependiente de la dosis. En comparación con quimAB 64A, las variantes de sustitución de aminoácidos mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron actividades de CDC similares sobre las células NEC8 (figura 31b).

Los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron actividad de ADCC dependiente de la dosis e indujeron ADCC incluso a concentraciones de anticuerpo bajas en líneas celulares tumorales NEC8 y OV90 (figura 32a).

La figura 32b muestra la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 quimAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG sobre células NEC8 de tipo salvaje y NEC8 con inactivación. Para demostrar la especificidad de diana se utilizaron células NEC8 con una inactivación estable de CLDN6.

Un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado utilizando ratones injertados con la línea celular tumoral NEC8 demostró que en comparación con el grupo de control de anticuerpo, los anticuerpos específicos de CLDN6

mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS inhibían el crecimiento tumoral (figura 33).

Las curvas de crecimiento en la figura 34a demuestran que los anticuerpos monoclonales quiméricos anti-CLDN6 mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS son capaces de inhibir el crecimiento tumoral. El gráfico de supervivencia en la figura 34b muestra una supervivencia prolongada de los ratones tratados con anticuerpos específicos de CLDN6.

El mapeado de epítopos de alta resolución de quimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS demostró que los aminoácidos F35, G37 y S39 y potencialmente T33 del primer dominio extracelular de CLDN6 son importantes para la interacción con los anticuerpos quiméricos específicos de CLDN6. QuimAB 64A, mAb206-LCC, mAb206-SUBG y mAb206-SUBS mostraron patrones de unión idénticos (figura 35).

Para someter a ensayo el efecto terapéutico del anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A en un modelo de xenoinjerto de metástasis, se inyectaron células NEC8 en la vena de la cola de ratones Nude-FoxnI^{nu} atímicos. Tres días después de la injertación se trataron los ratones con el anticuerpo específico de CLDN6 muMAB 64A. Tras 8 semanas, se prepararon los pulmones y se analizó la carga tumoral mediante PCR. En comparación con el grupo de control de PBS, el anticuerpo monoclonal murino anti-CLDN6 muMAB 64A mostró claramente la inhibición del crecimiento tumoral (figura 36).

La tinción inmunohistoquímica de los tejidos humanos de cáncer y normales utilizando los anticuerpos monoclonales muMAB 64A, mAb206-LCC y mAb206-SUBG reveló que, en contraste con los tejidos normales, se observaba una tinción fuerte y homogénea en las secciones de tejidos de los cánceres ovárico y de testículo. Se detectó una tinción membranal muy fuerte de las poblaciones celulares epiteliales malignas, mientras que las células estromales y no malignas contiguas no se observaban teñidas (figura 37). Estos resultados demuestran claramente que los anticuerpos específicos de CLDN6 de los presentes inventores se unen específicamente a las células malignas derivadas de los pacientes tumorales (explicación: número de tejidos que se habían teñido con anticuerpo/número de tejidos analizados).

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a CLDN6 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN6 y que no se une de manera detectable a CLDN9 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN9, comprendiendo el método las etapas de:

(a) cultivar una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno; y

(b) aislar el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno expresado por la célula huésped;

en donde la célula huésped transformada comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo que tienen las secuencias de aminoácidos de las posiciones 26-33, posiciones 51-58 y posiciones 97-106 de SEQ ID NO: 36, respectivamente, o una variante de la misma; y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo que tienen las secuencias de aminoácidos de las posiciones 27-31, posiciones 49-51 y posiciones 88-97 de SEQ ID NO: 35, respectivamente, o una variante de la misma,

en donde la variante comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 47, 48 y 46, respectivamente, y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, 53 y 51, respectivamente

en donde la unión del anticuerpo a CLDN6 y CLDN9 se determina mediante análisis de citometría de flujo como la unión del anticuerpo a CLDN6 y CLDN9 expresado en la superficie de células intactas.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende transformar la célula huésped con un vector de expresión que comprende dicha secuencia de ácido nucleico y en el que el vector de expresión comprende una secuencia promotora, una secuencia líder, una secuencia de iniciación de la traducción, una región constante de cadena ligera, una región constante de cadena pesada, una secuencia no traducida 3', una secuencia de poliadenilación o una secuencia de terminación de la transcripción.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el fragmento de unión al antígeno es un Fab, $F(ab')_2$, Fv o Fv de cadena sencilla.

4. Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo que tienen las secuencias de aminoácidos de las posiciones 26-33, posiciones 51-58 y posiciones 97-106 de SEQ ID NO: 36, respectivamente, o una variante de las mismas; y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo que tienen las secuencias de aminoácidos de las posiciones 27-31, posiciones 49-51 y posiciones 88-97 de SEQ ID NO: 35, respectivamente, o una variante de la misma,

en donde la variante comprende regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 47, 48 y 46, respectivamente, y regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que tienen secuencias de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 52, 53 y 51, respectivamente,

en donde el anticuerpo se une a CLDN6 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN6 y no se une de manera detectable a CLDN9 asociado con la superficie de una célula que expresa CLDN9 y en donde la unión del anticuerpo a CLDN6 y CLDN9 se determina mediante análisis de citometría de flujo como unión del anticuerpo contra CLDN6 y CLDN9 expresado en la superficie de células intactas.

5. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 4, en el que la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35.

6. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 4 o 5, en el que la secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a secuencias de control de expresión.

7. Una célula humana que expresa un polipéptido codificado por el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

8. Un polipéptido codificado por el ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 u obtenible a partir de la célula humana de la reivindicación 7.

9. Un anticuerpo anti-CLDN6 expresado por la célula humana de la reivindicación 7.

10. Un fragmento de unión a antígeno expresado por la célula humana de la reivindicación 7, en el que el fragmento de unión a antígeno se une a CLDN6 y es preferiblemente un Fab, $F(ab')_2$, Fv o Fv de cadena sencilla.

11. El fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 10, en el que el fragmento de unión a antígeno está fusionado a una región bisagra de inmunoglobulina.

12. Un método *in vitro* para producir una célula huésped eucariota recombinante, que comprende las etapas de:

a. transformar una célula eucariota con un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6; y

b. obtener la célula transformada, en el que la célula transformada comprende el ácido nucleico recombinante.

13. El método de la reivindicación 12, en el que la célula huésped eucariota recombinante es una célula humana.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 12 y 13 o la célula humana de la reivindicación 7, en donde dicha célula es una célula HEK293, una célula HEK293T, una célula dendrítica, una célula B, una célula K562, una célula HELA o una célula linfocítica.

Fig. 1

```
                                                                  Bucle extracelular 1
CLDN6  (SEC ID nº  2)     MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN9  (SEC ID nº  9)     MASTGLELLGMTLAVLGWLGTLVSCALPLWKVTAFIGNSIVVAQVVWEGLWMSCVVQSTG 60
CLDN4  (SEC ID nº  10)    MASMGLQVMGIALAVLGWLAVMLCCALPMWRVTAFIGSNIVTSQTIWEGLWMNCVVQSTG 60
CLDN3  (SEC ID nº  11)    -MSMGLEITGTALAVLGWLGTIVCCALPMWRVSAFIGSNIITSQNIWEGLWMNCVVQSTG 59
                            * *::: * .*::***:  ::.****:*:*:****..*:.:* :******.*******

CLDN6  (SEC ID nº  2)     QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLVALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLT 120
CLDN9  (SEC ID nº  9)     QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALLLALLGLLVAITGAQCTTCVEDEGAKARIVLT 120
CLDN4  (SEC ID nº  10)    QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALVIISIIVAALGVLLSVVGGKCTNCLEDESAKAKTMIV 120
CLDN3  (SEC ID nº  11)    QMQCKVYDSLLALPQDLQAARALIVVAILLAAFGLLVALVGAQCTNCVQDDTAKAKITIV 119
                          *********************** ::::::* :*:*: :.*.:**.*:::. :**:  :.

                                                        Bucle extracelular 2
CLDN6  (SEC ID nº  2)     SGIVFVISGVLTLIPVCWTAHAIIRDFYNPLVAEAQKRELGASLYLGWAASGLLLLGGGL 180
CLDN9  (SEC ID nº  9)     AGVILLLAGILVLIPVCWTAHAIIQDFYNPLVAEALKRELGASLYLGWAAAALLMLGGGL 180
CLDN4  (SEC ID nº  10)    AGVVFLLAGLMVIVPVSWTAHNIIQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGWAASGLLLLGGGL 180
CLDN3  (SEC ID nº  11)    AGVLFLLAALLTLVPVSWSANTIIRDFYNPVVPEAQKREMGAGLYVGWAAAALQLLGGAL 179
                          :*::::::.::.::**.*:*: **:*****:*... ***:**.**:****:.* :***.*

CLDN6  (SEC ID nº  2)     LCCTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAISRGPSEYP-----TKNYV 220
CLDN9  (SEC ID nº  9)     LCCTCPPPQVERPRG--PRLGYSIPSRS-GASGLD-----KRDYV 217
CLDN4  (SEC ID nº  10)    LCCNCPPRT---DKPYSAK---YSAARSAAASN----------YV 209
CLDN3  (SEC ID nº  11)    LCCSCPPR----EKKYTATKVVYSAPRSTGPGASLGTGYDRKDYV 220
                          ***.**.          .      .. * ...           **
```

Fig. 2A

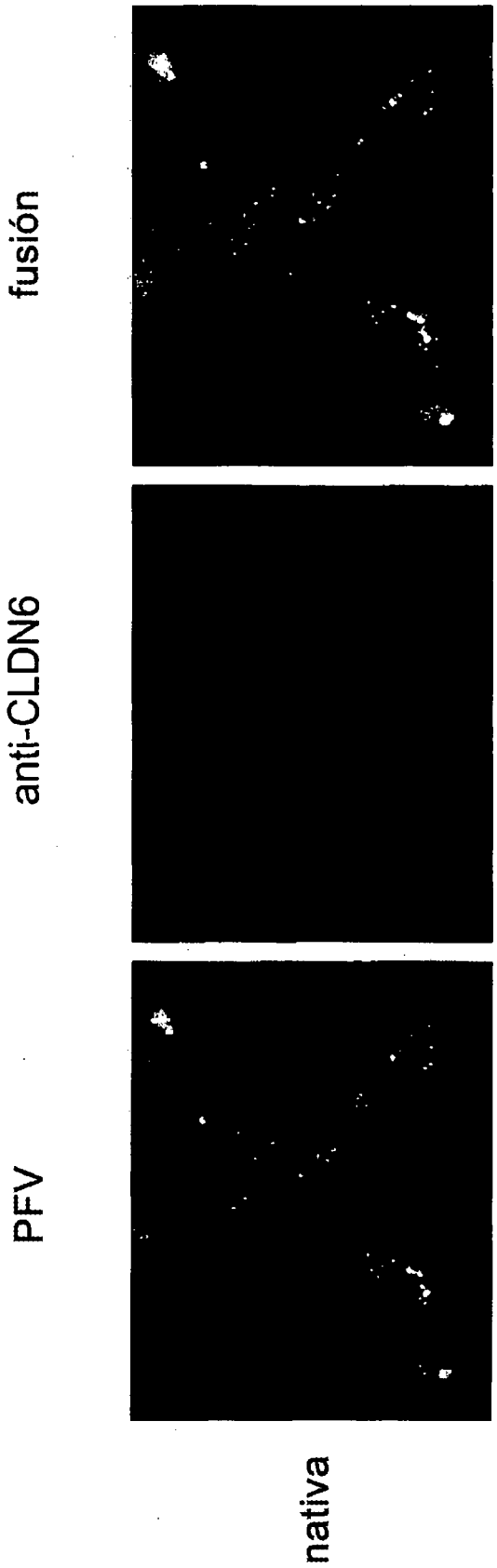


Fig. 2B

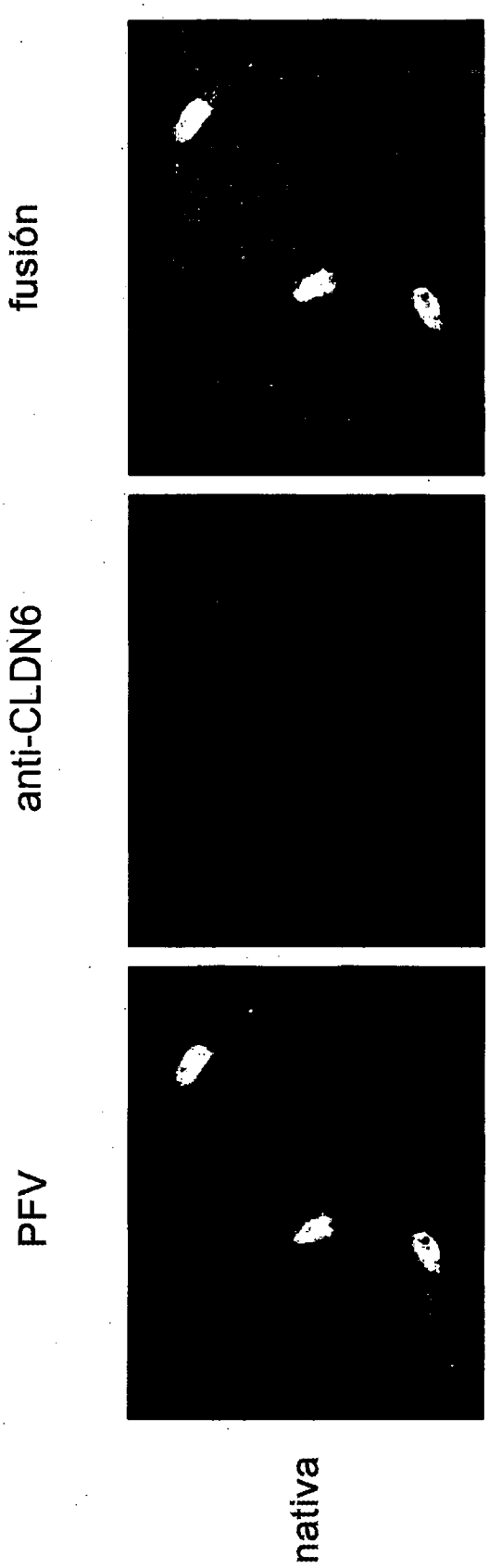


Fig. 3

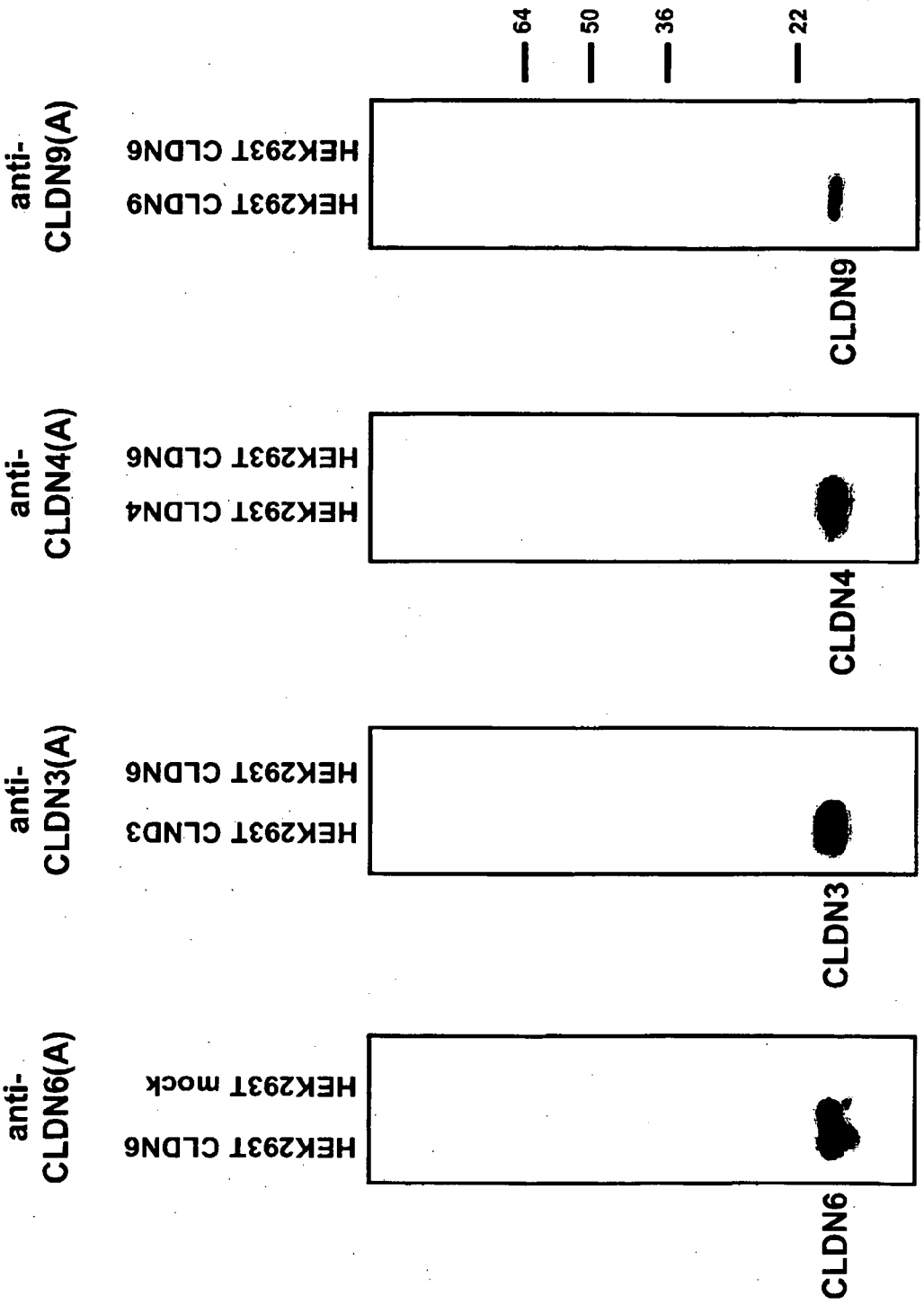

anti-
CLDN6(A)
HEK293T CLDN6
HEK293T mock
CLDN6
anti-
CLDN3(A)
HEK293T CLDN6
HEK293T CLND3
CLDN3
anti-
CLDN4(A)
HEK293T CLDN6
HEK293T CLDN4
CLDN4
anti-
CLDN9(A)
HEK293T CLDN6
HEK293T CLDN9
CLDN9
64
50
36
22

Fig. 4

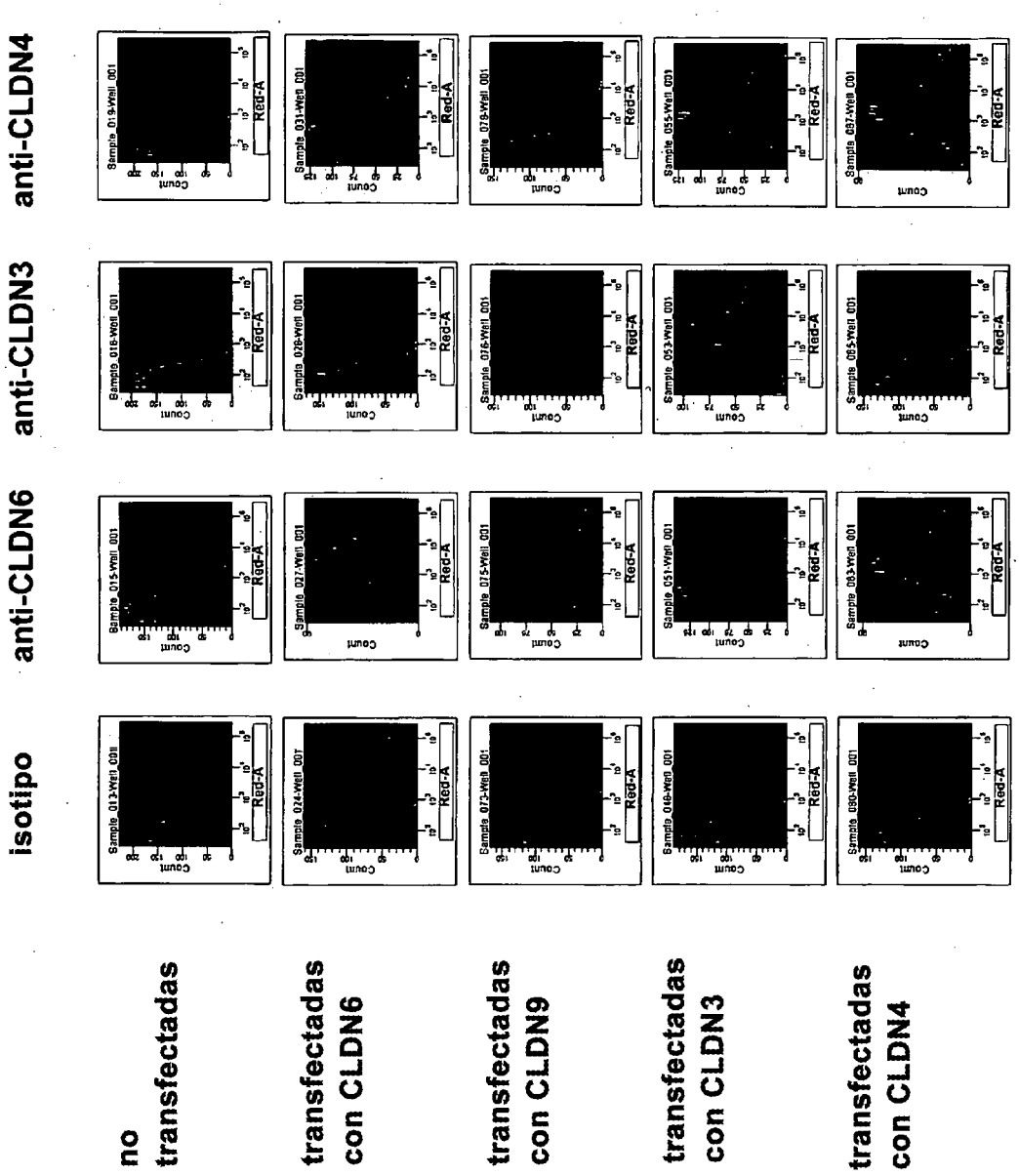
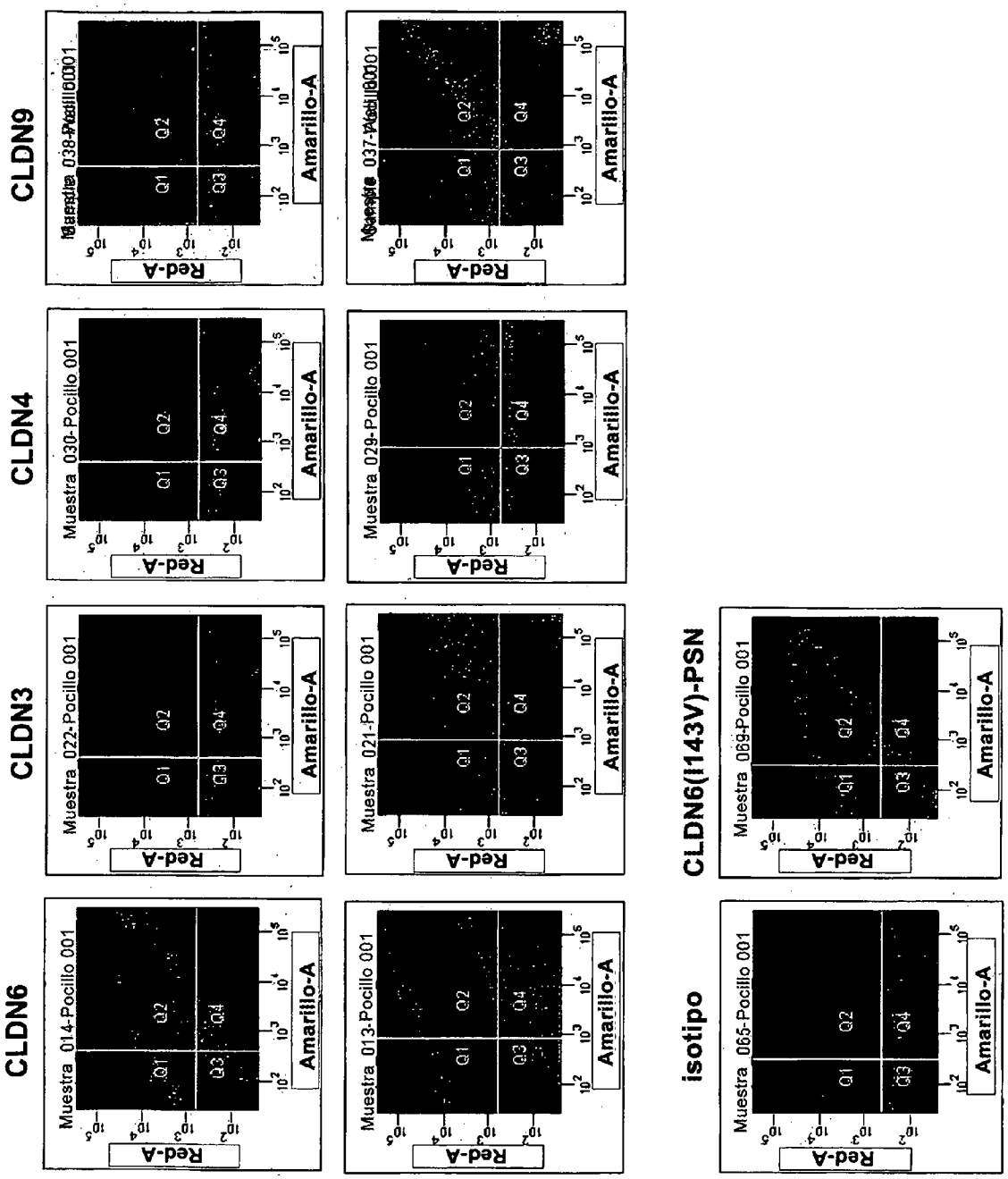

isotipo
anti-CLDN6
anti-CLDN3
anti-CLDN4
no transfectadas
transfectadas con CLDN6
transfectadas con CLDN9
transfectadas con CLDN3
transfectadas con CLDN4

Fig. 5A

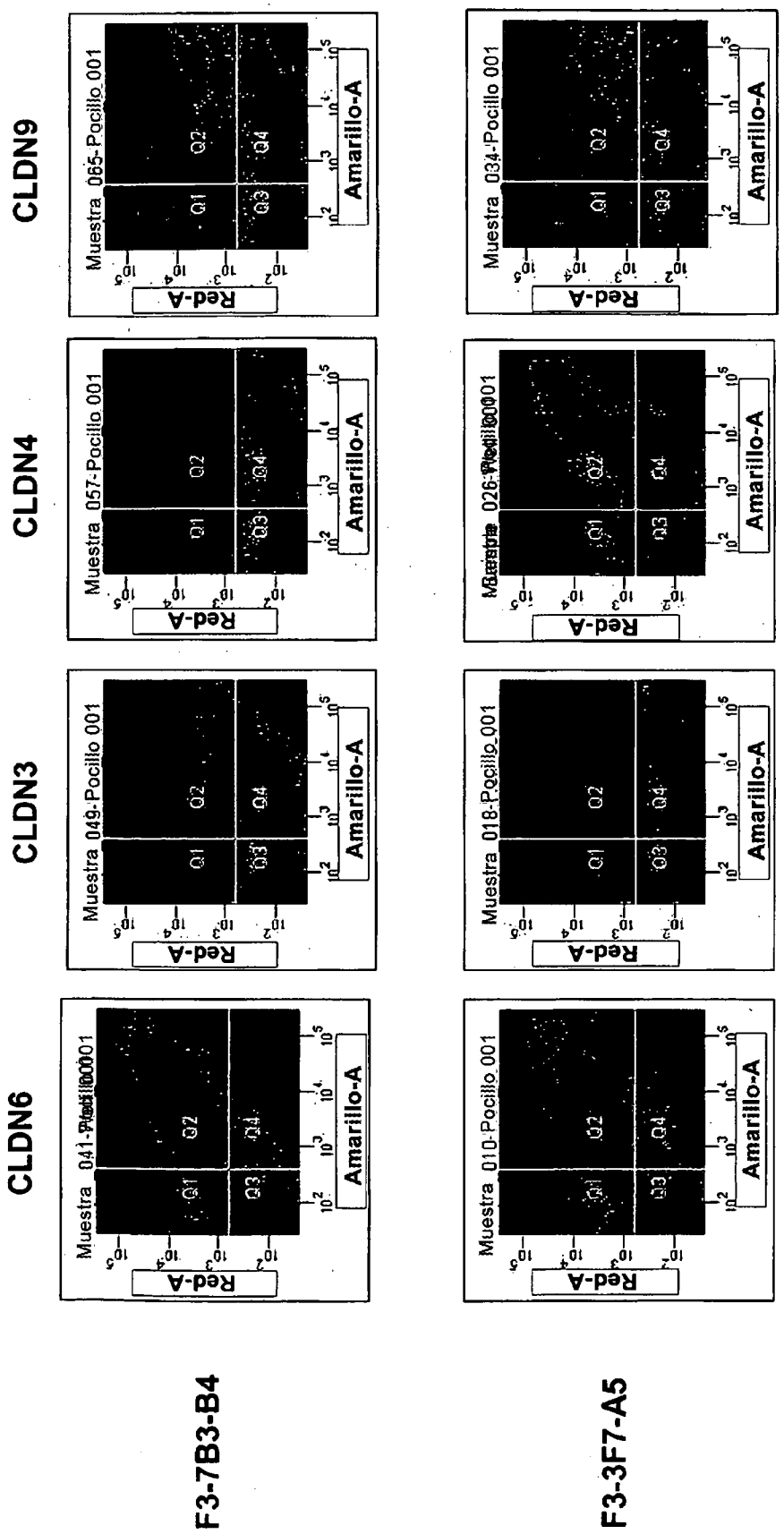


F3-6C3-H8

F4-4F7-F2

F3-6C3-H8

Fig. 5B


CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9
Muestra 041-Pocillo 001
Muestra 049-Pocillo 001
Muestra 057-Pocillo 001
Muestra 065-Pocillo 001
Muestra 010-Pocillo 001
Muestra 018-Pocillo 001
Muestra 026-Pocillo 001
Muestra 034-Pocillo 001
Red-A
Amarillo-A
Q1
Q2
Q3
Q4
F3-7B3-B4
F3-3F7-A5

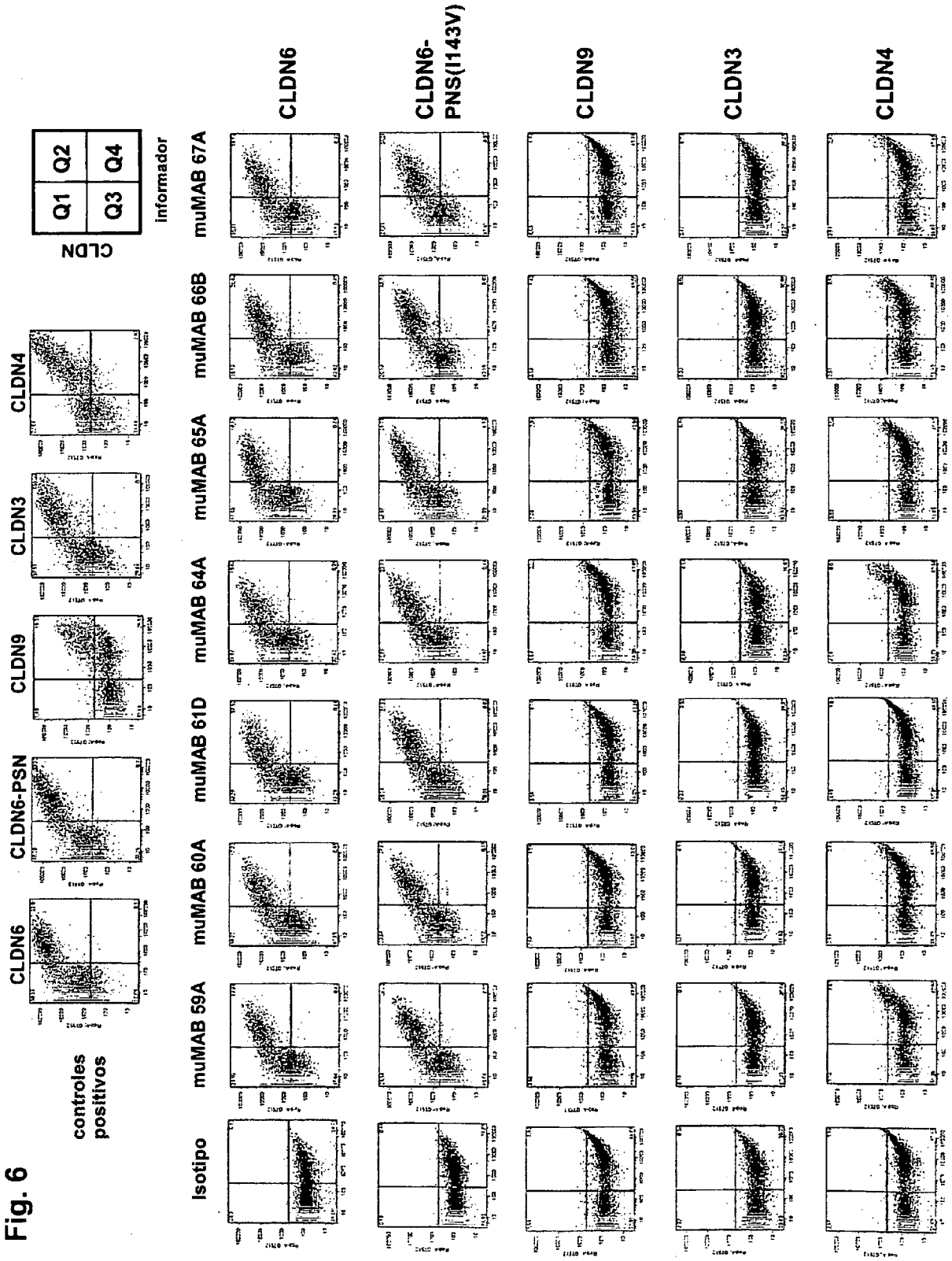


Fig. 6
controles positivos
CLDN6
CLDN6-PSN
CLDN9
CLDN3
CLDN4
CLDN
Q1
Q2
Q3
Q4
informador
Isotipo
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
CLDN6
CLDN6-PNS(I143V)
CLDN9
CLDN3
CLDN4

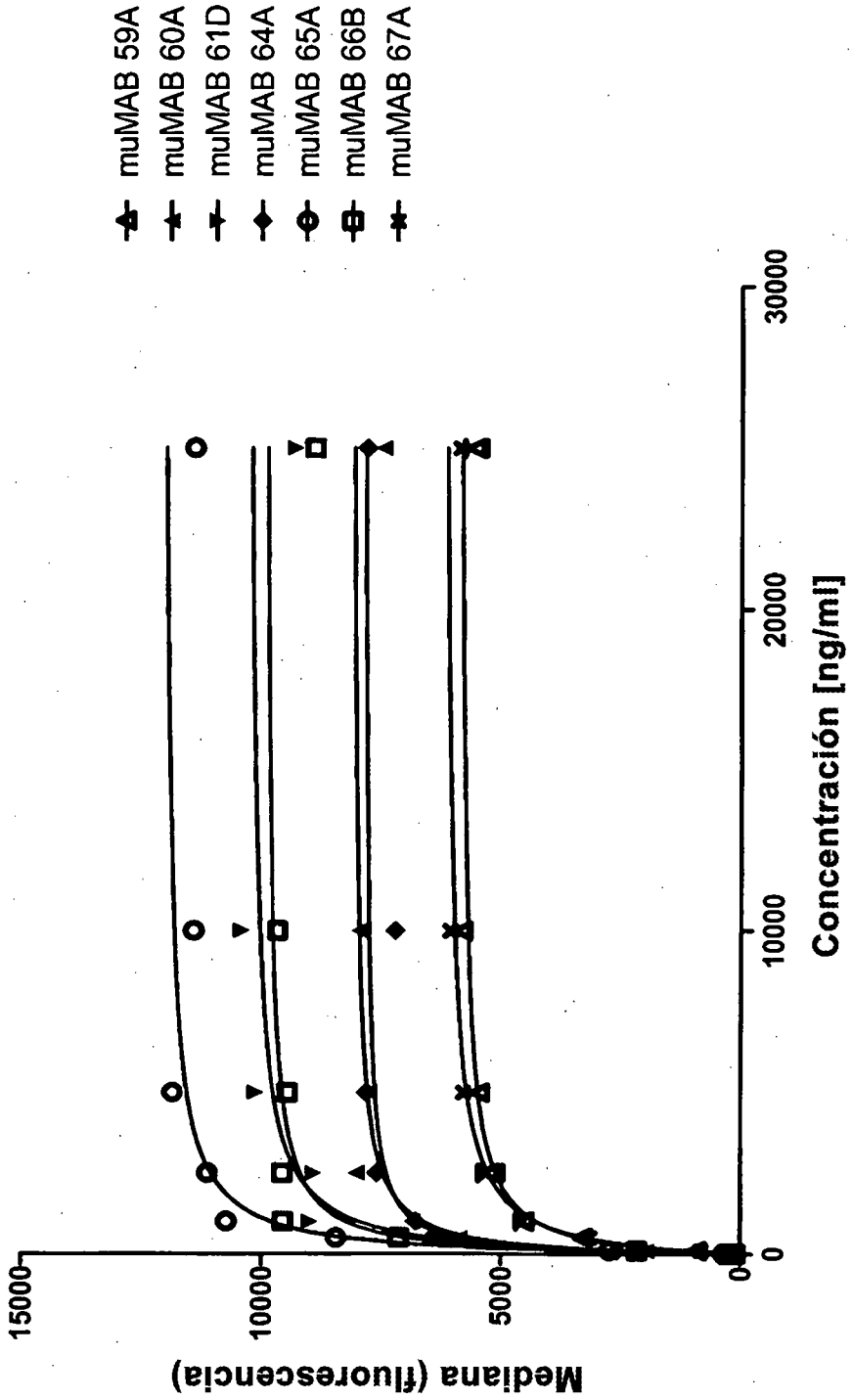

muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Mediana (fluorescencia)
15000
10000
5000
0
0
10000
20000
30000
Concentración [ng/ml]

Fig. 7

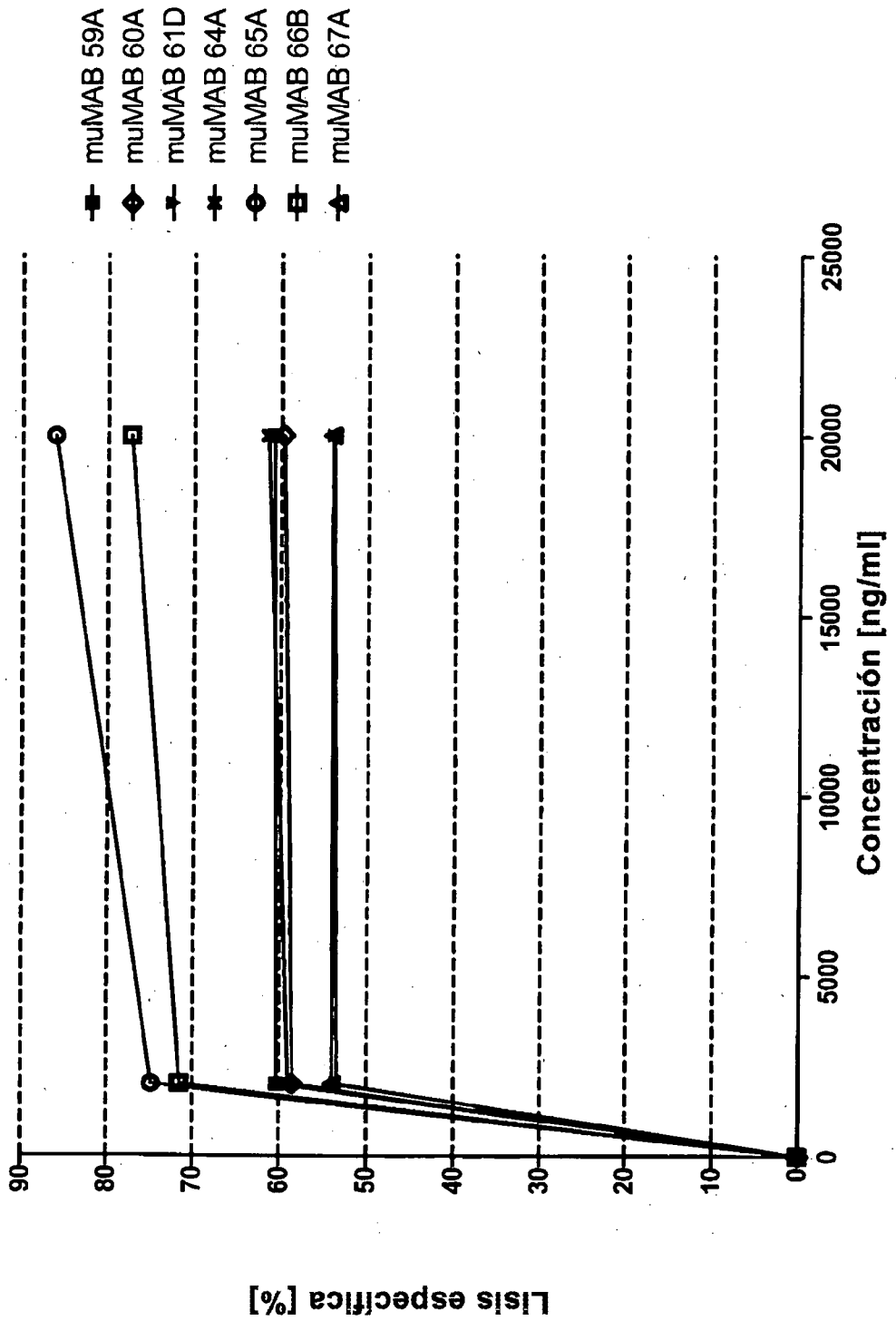

muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Lisis específica [%]
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5000
10000
15000
20000
25000
Concentración [ng/ml]

Fig. 8

Fig. 9

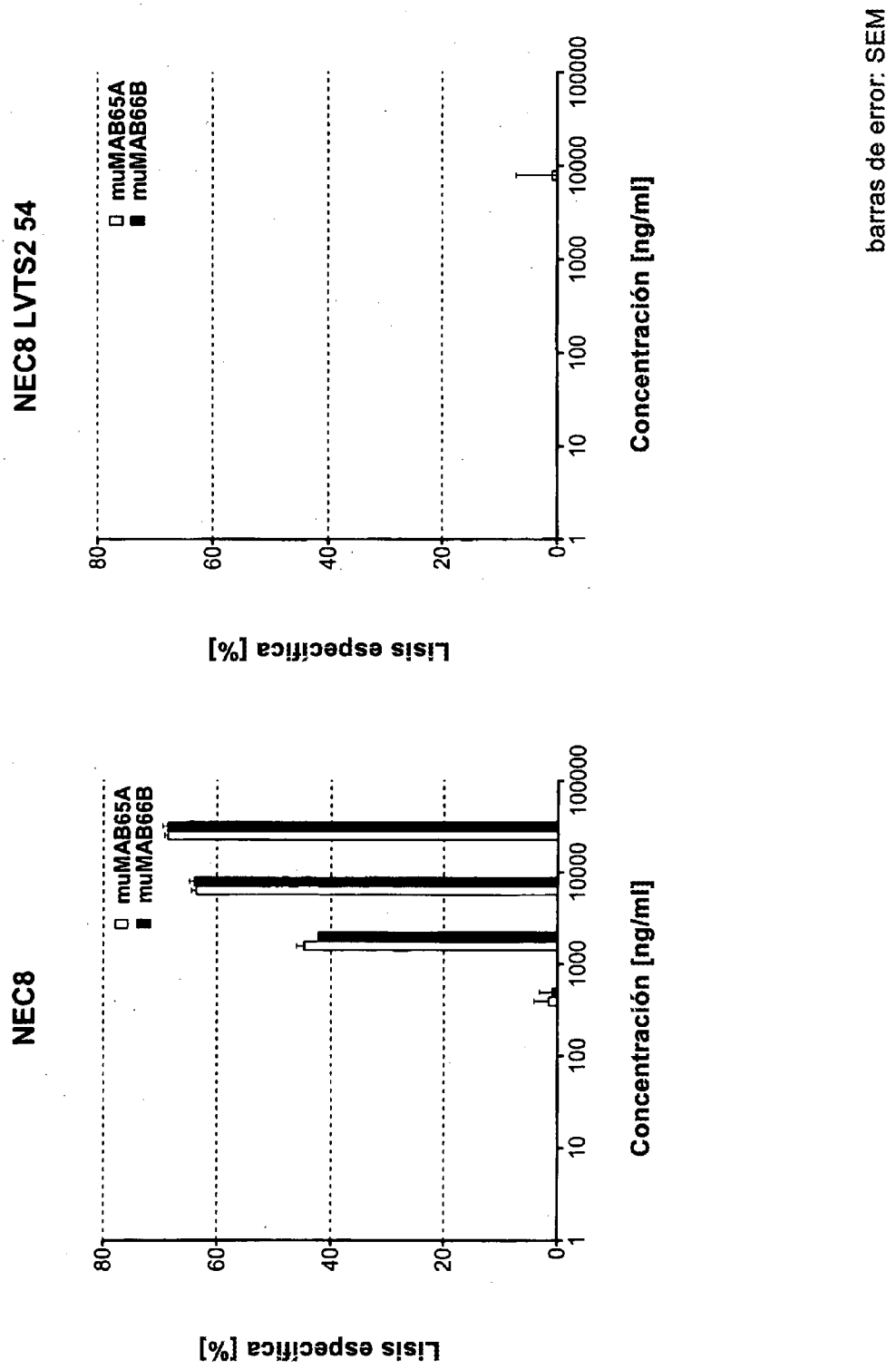
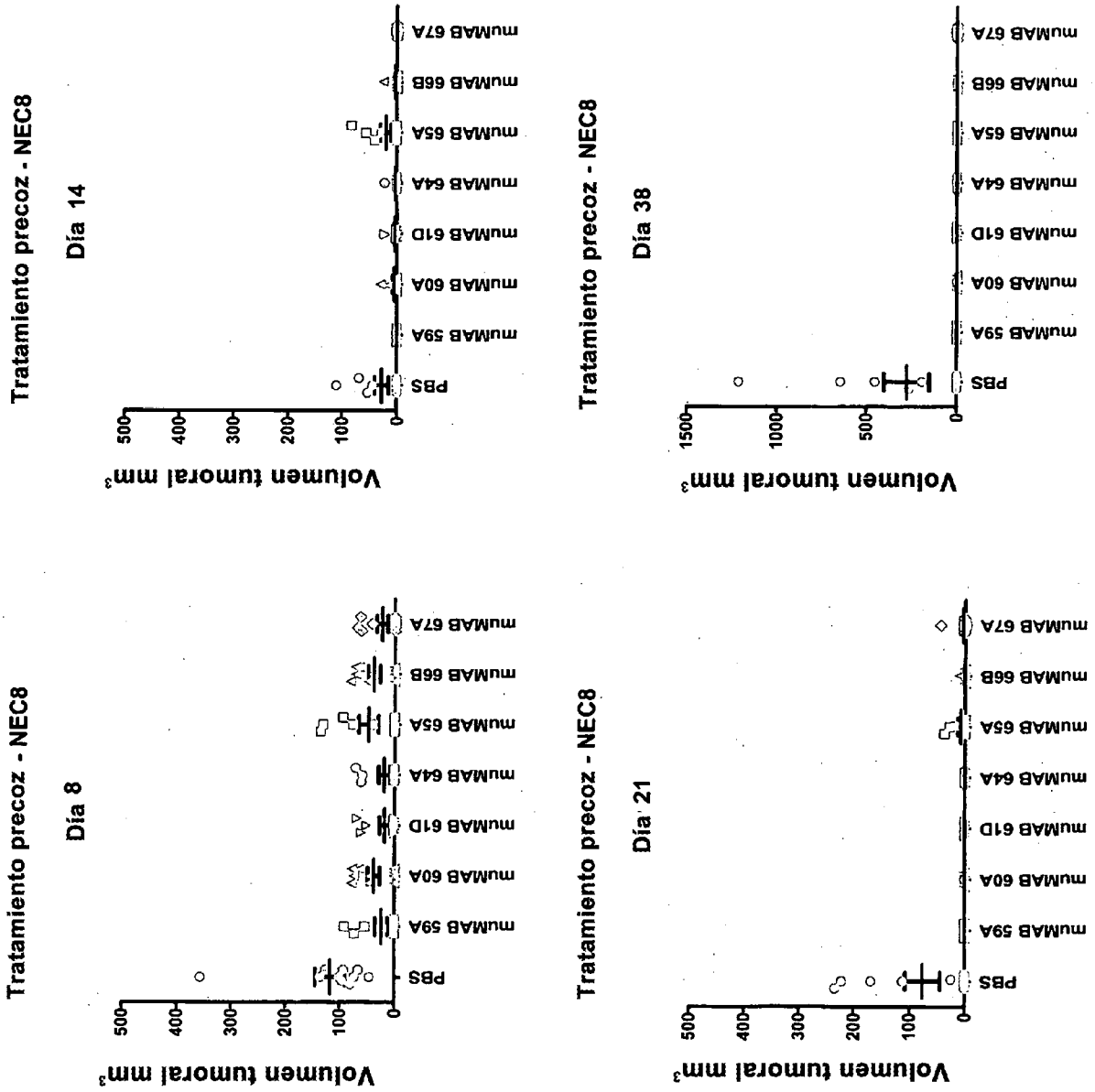

NEC8
muMAB65A
muMAB66B
Lisis específica [%]
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
100000
Concentración [ng/ml]
NEC8 LVTS2 54
muMAB65A
muMAB66B
Lisis específica [%]
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
10000
100000
Concentración [ng/ml]
barras de error: SEM

Fig. 10


Tratamiento precoz - NEC8
Día 8
Volumen tumoral mm³
0
100
200
300
400
500
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Tratamiento precoz - NEC8
Día 14
Volumen tumoral mm³
0
100
200
300
400
500
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Tratamiento precoz - NEC8
Día 21
Volumen tumoral mm³
0
100
200
300
400
500
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A
Tratamiento precoz - NEC8
Día 38
Volumen tumoral mm³
0
500
1000
1500
PBS
muMAB 59A
muMAB 60A
muMAB 61D
muMAB 64A
muMAB 65A
muMAB 66B
muMAB 67A

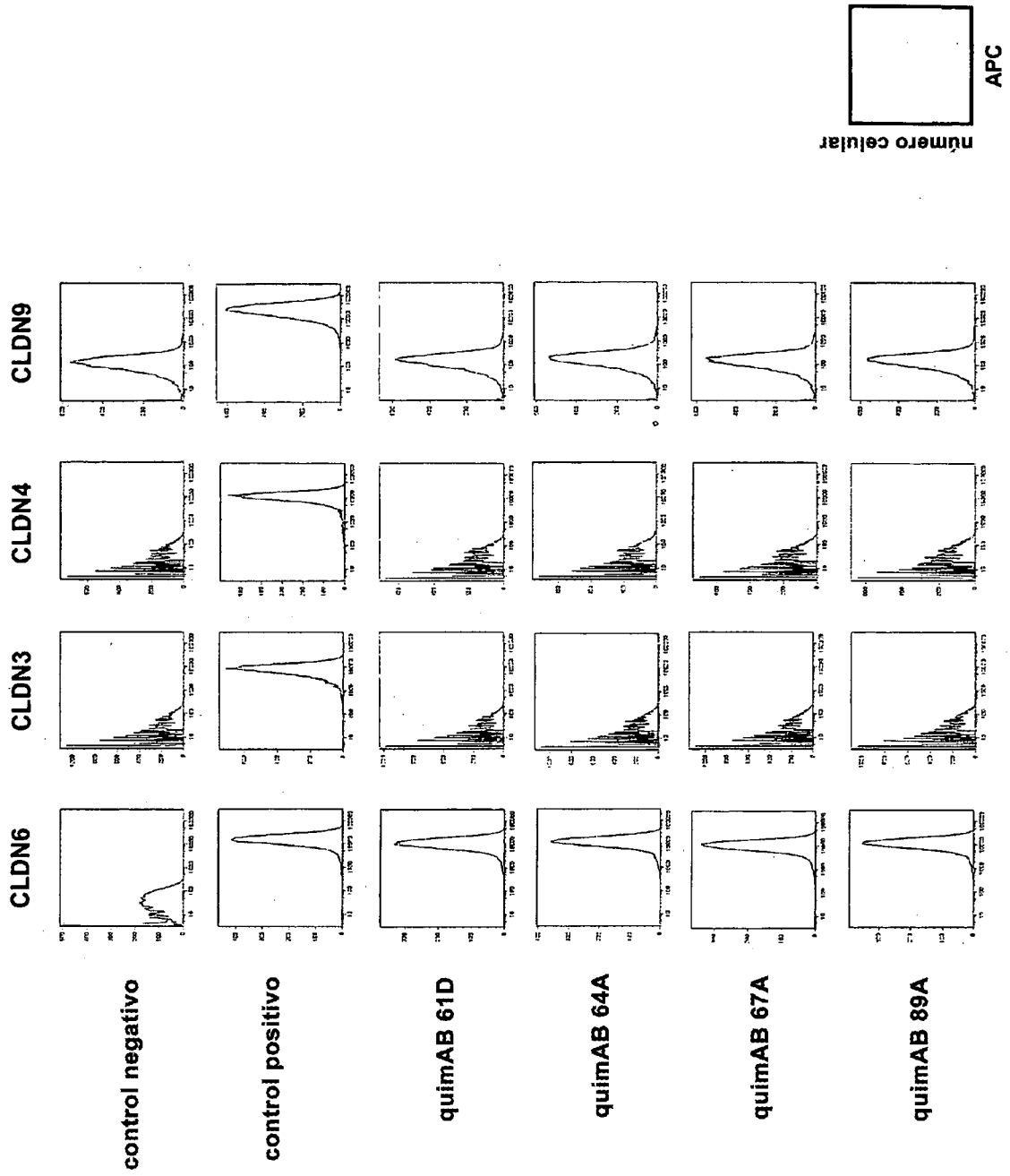

CLDN6
CLDN3
CLDN4
CLDN9
control negativo
control positivo
quimAB 61D
quimAB 64A
quimAB 67A
quimAB 89A
número celular
APC

Fig. 11

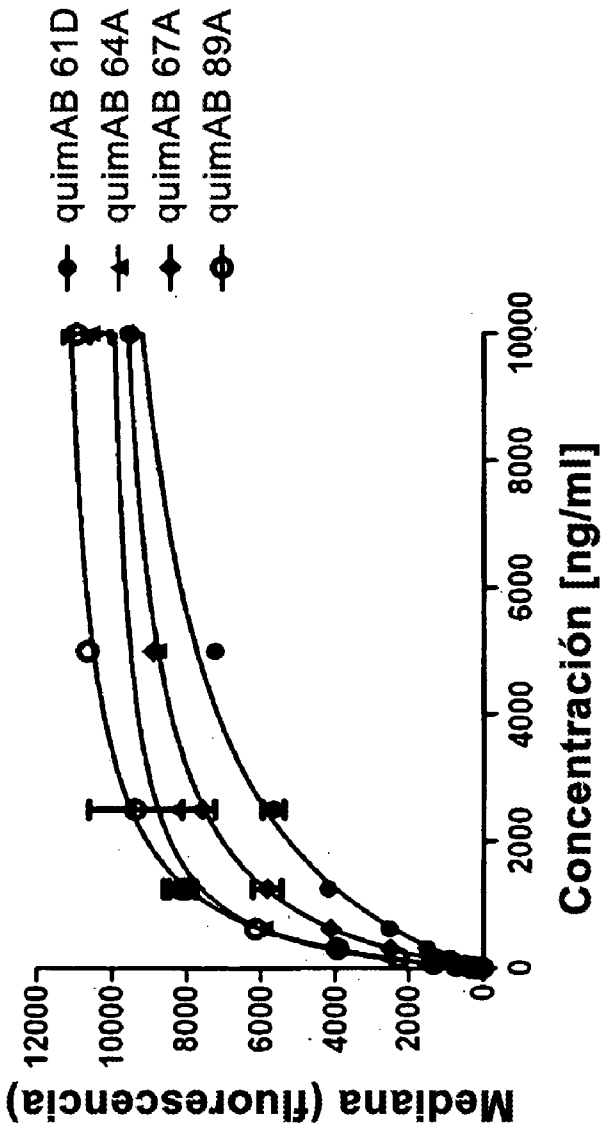

Unión a HEK293-CLDN6
Mediana (fluorescencia)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
Concentración [ng/ml]
quimAB 61D
quimAB 64A
quimAB 67A
quimAB 89A

Fig. 12

Fig. 13

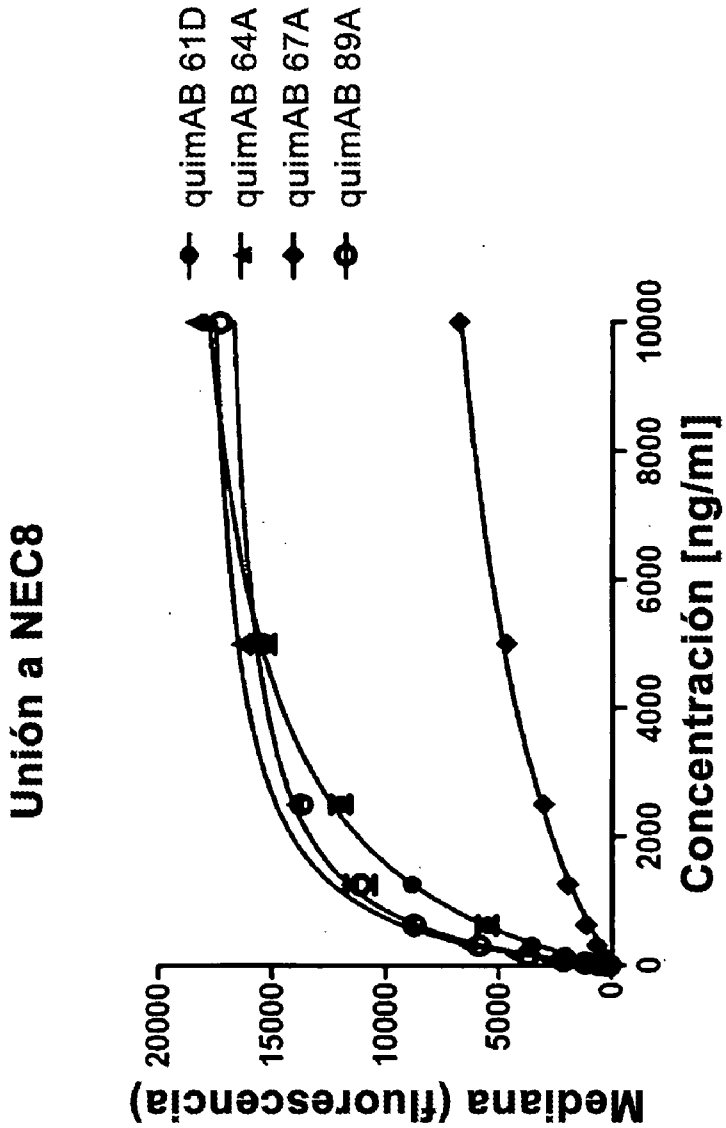

Unión a NEC8
quimAB 61D
quimAB 64A
quimAB 67A
quimAB 89A
Mediana (fluorescencia)
20000
15000
10000
5000
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
Concentración [ng/ml]

Fig. 14

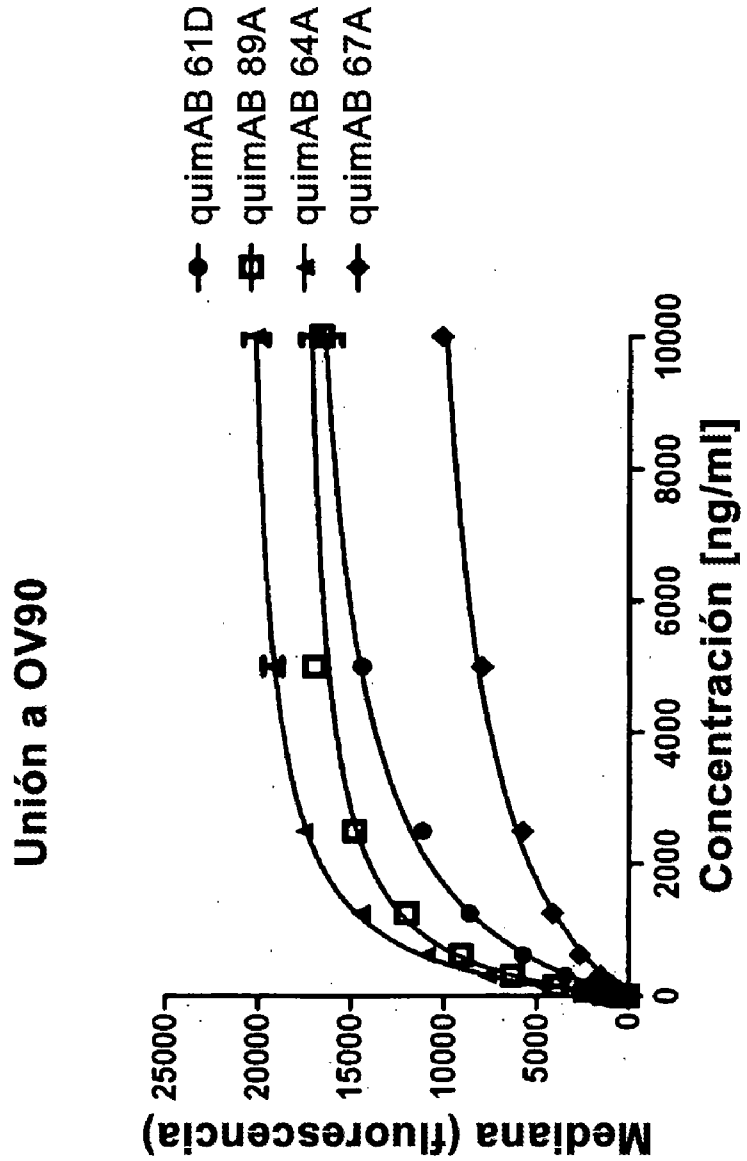

Unión a OV90
Mediana (fluorescencia)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
Concentración [ng/ml]
quimAB 61D
quimAB 89A
quimAB 64A
quimAB 67A

Fig. 15

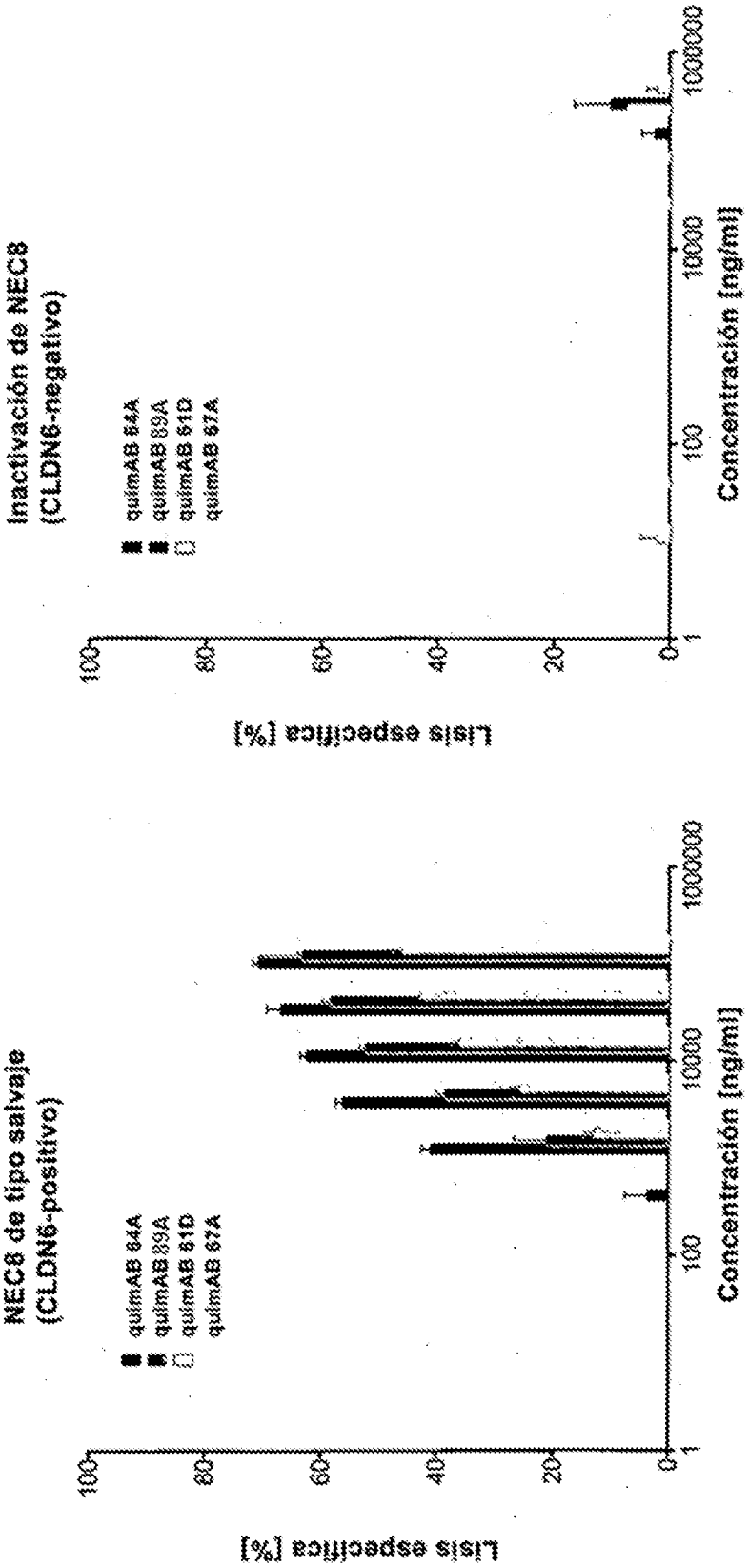

NEC8 de tipo salvaje
(CLDN6-positivo)
quimAB 84A
quimAB 89A
quimAB 81D
quimAB 87A
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]
Inactivación de NEC8
(CLDN6-negativo)
quimAB 84A
quimAB 89A
quimAB 81D
quimAB 87A
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]

Fig. 16

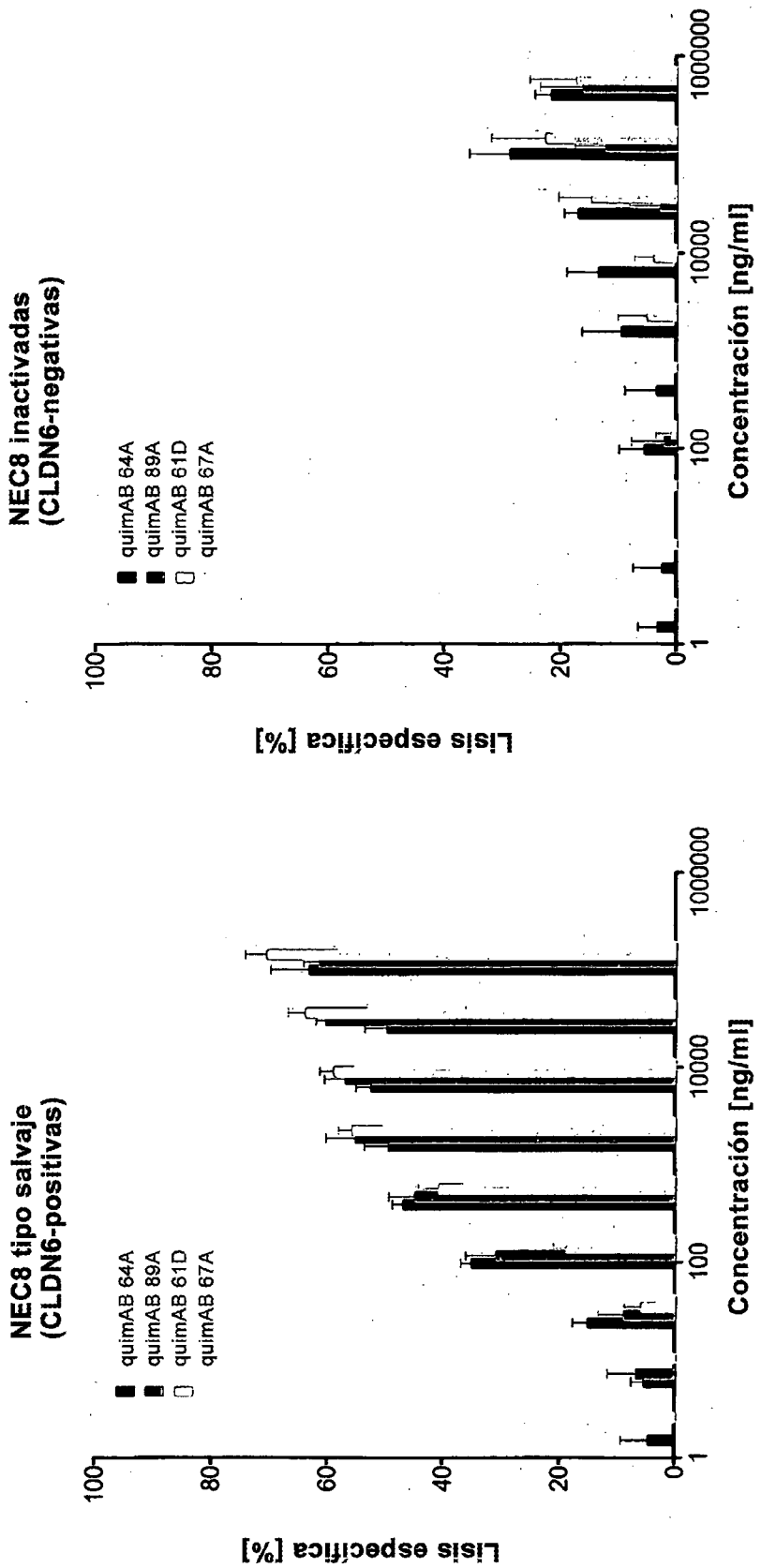

NEC8 inactivadas
(CLDN6-negativas)
quimAB 64A
quimAB 89A
quimAB 61D
quimAB 67A
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]
NEC8 tipo salvaje
(CLDN6-positivas)
quimAB 64A
quimAB 89A
quimAB 61D
quimAB 67A
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]

Fig. 17

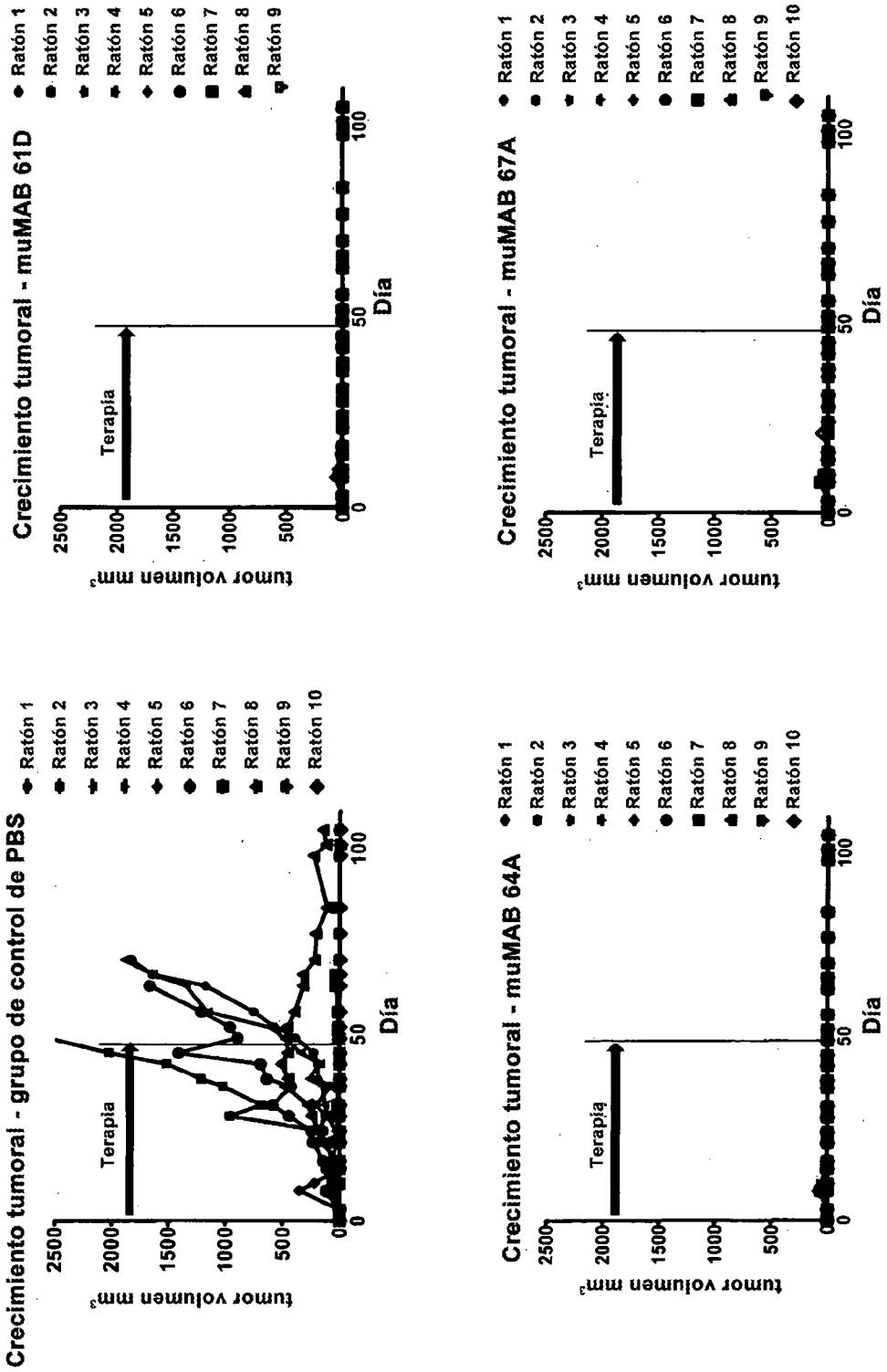

Crecimiento tumoral - grupo de control de PBS
Crecimiento tumoral - muMAB 64A
Crecimiento tumoral - muMAB 61D
Crecimiento tumoral - muMAB 67A
tumor volumen mm³
Día
Terapia
0
50
100
500
1000
1500
2000
2500
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8
Ratón 9
Ratón 10

Fig. 18

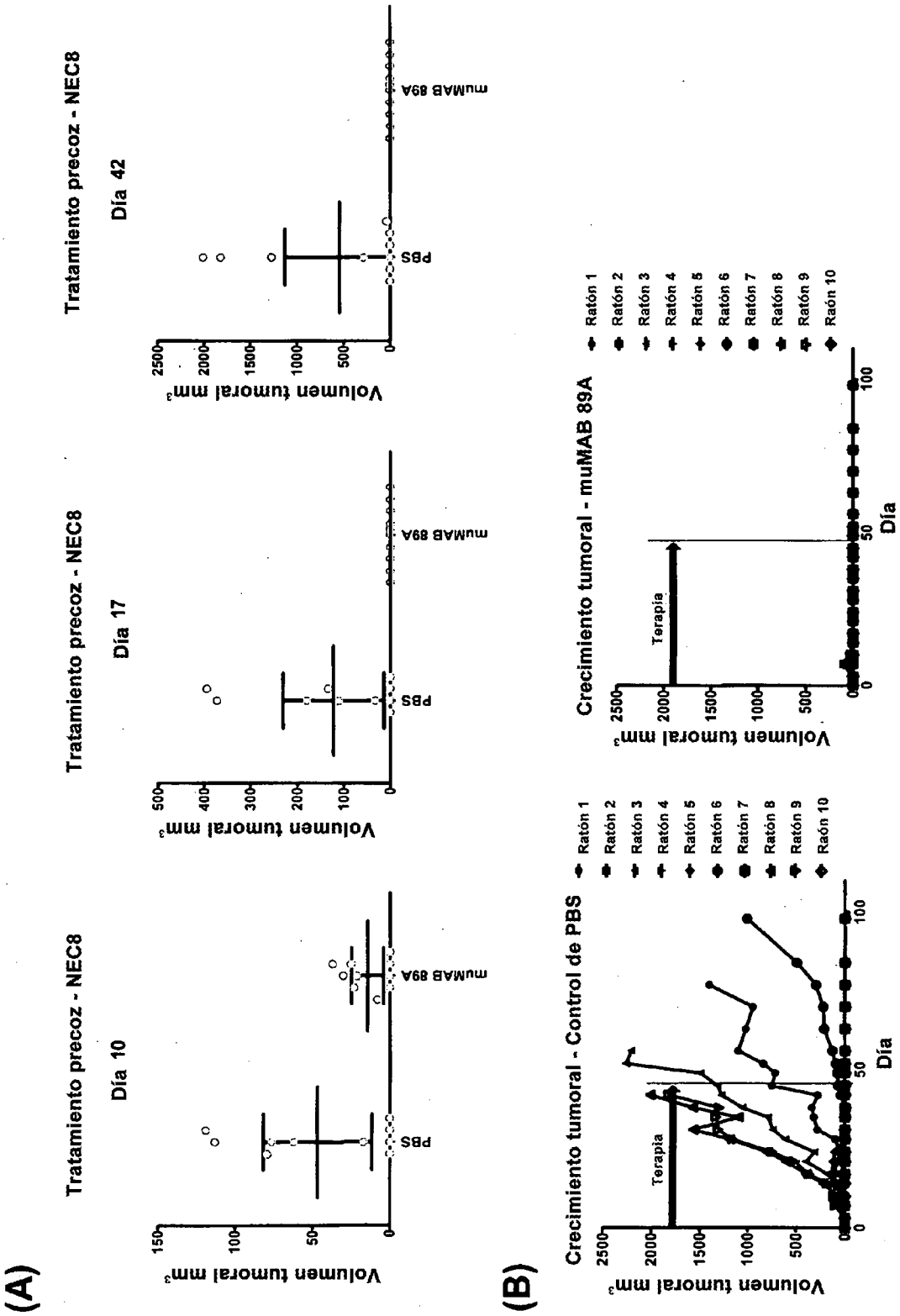

(A)
Tratamiento precoz - NEC8
Día 10
Volumen tumoral mm³
PBS
muMAB 89A
Tratamiento precoz - NEC8
Día 17
Volumen tumoral mm³
PBS
muMAB 89A
Tratamiento precoz - NEC8
Día 42
Volumen tumoral mm³
PBS
muMAB 89A
(B)
Crecimiento tumoral - Control de PBS
Volumen tumoral mm³
Terapia
Día
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8
Ratón 9
Raón 10
Crecimiento tumoral - muMAB 89A
Volumen tumoral mm³
Terapia
Día
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8
Ratón 9
Raón 10

Fig. 19

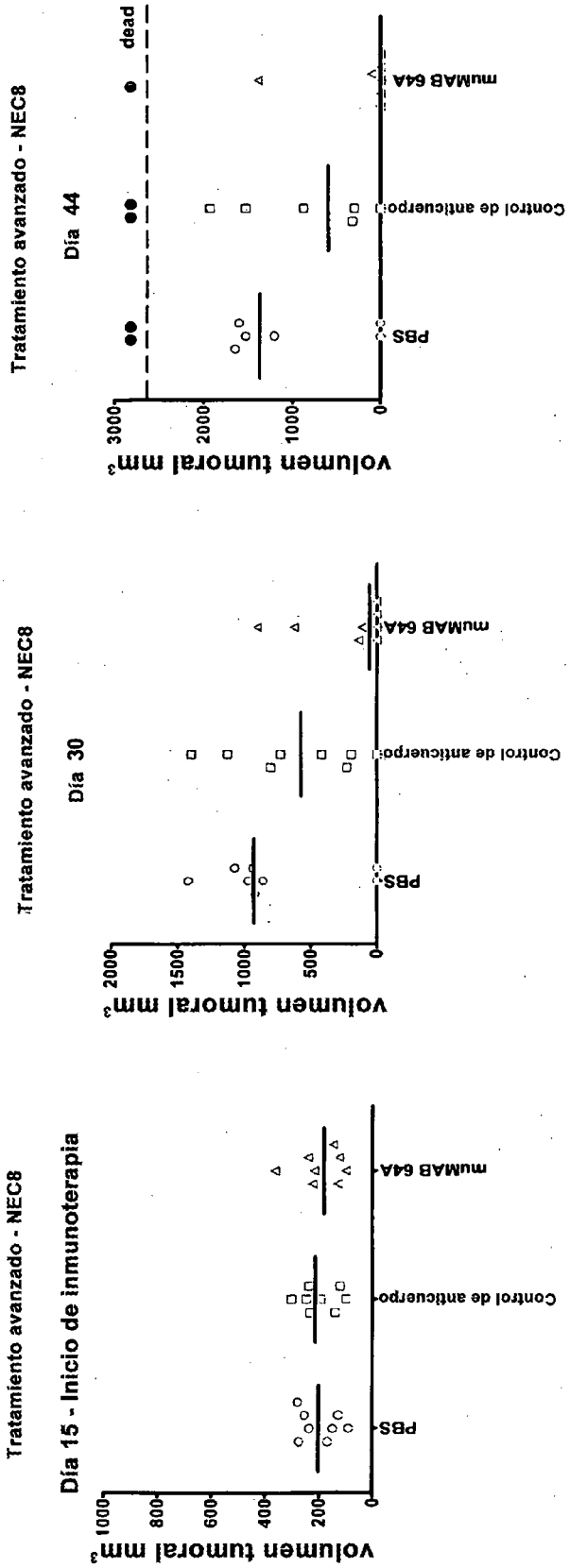

Tratamiento avanzado - NEC8
Día 15 - Inicio de inmunoterapia
Volumen tumoral mm³
1000
800
600
400
200
0
PBS
Control de anticuerpo
muMAB 64A
Tratamiento avanzado - NEC8
Día 30
Volumen tumoral mm³
2000
1500
1000
500
0
PBS
Control de anticuerpo
muMAB 64A
Tratamiento avanzado - NEC8
Día 44
Volumen tumoral mm³
3000
2000
1000
0
dead
PBS
Control de anticuerpo
muMAB 64A

Fig. 20

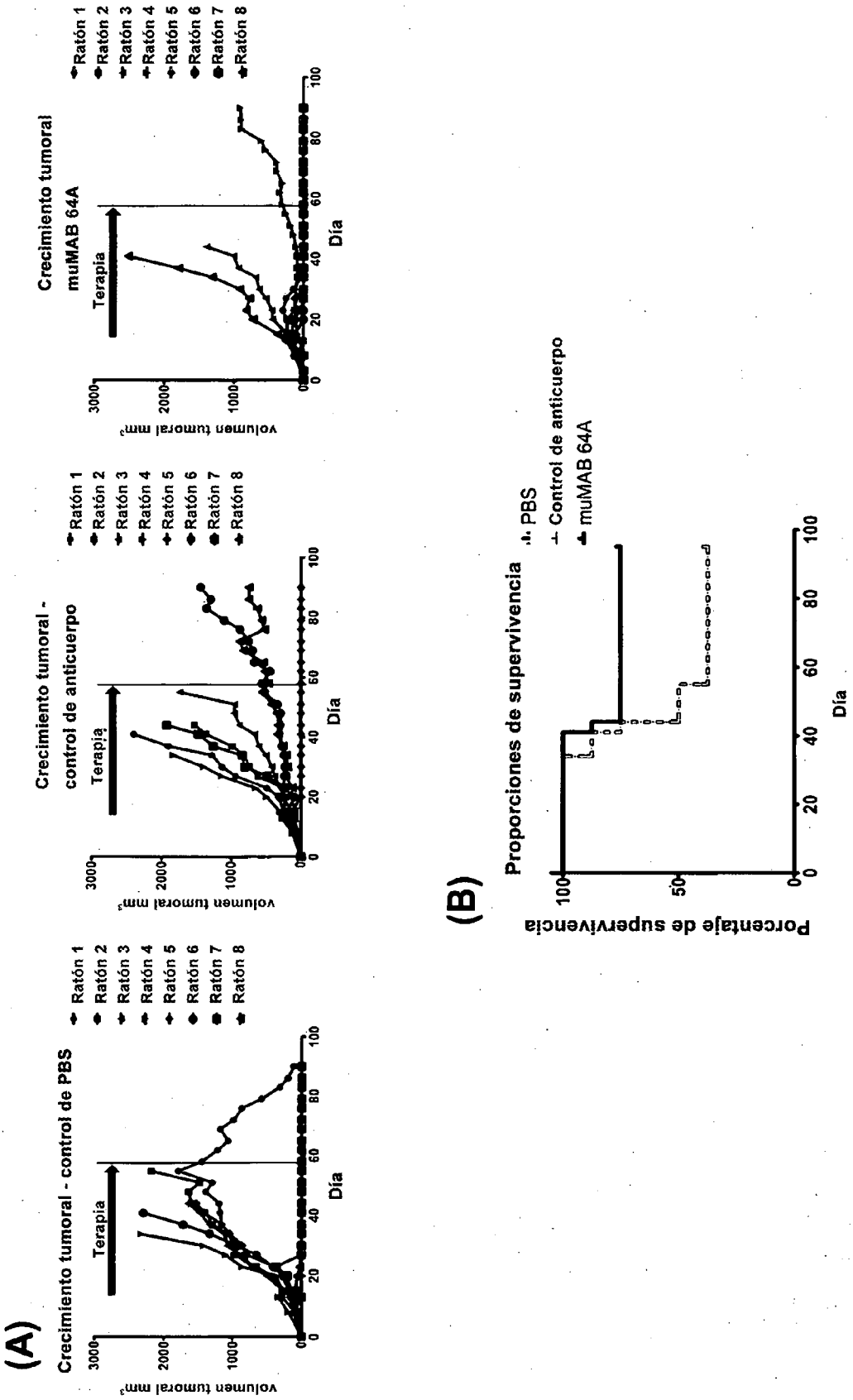

(A)
Crecimiento tumoral - control de PBS
Crecimiento tumoral - control de anticuerpo
Crecimiento tumoral muMAB 64A
Terapia
volumen tumoral mm³
Día
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8
(B)
Proporciones de supervivencia
PBS
Control de anticuerpo
muMAB 64A
Porcentaje de supervivencia
Día

Fig. 21

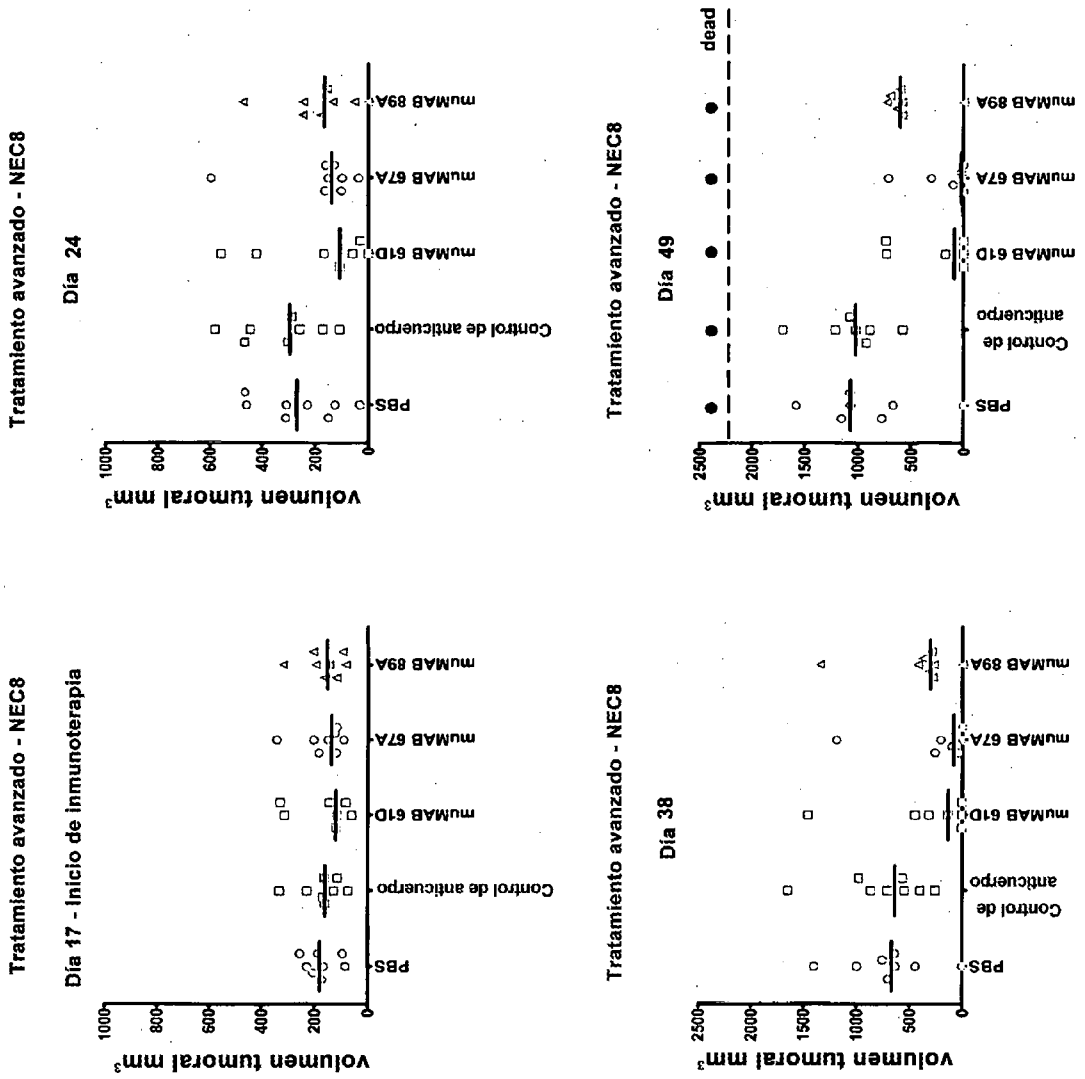

Tratamiento avanzado - NEC8
Día 17 - Inicio de inmunoterapia
Día 24
Día 38
Día 49
Volumen tumoral mm³
PBS
Control de anticuerpo
muMAB 61D
muMAB 67A
muMAB 89A
dead

Fig. 22

(A)

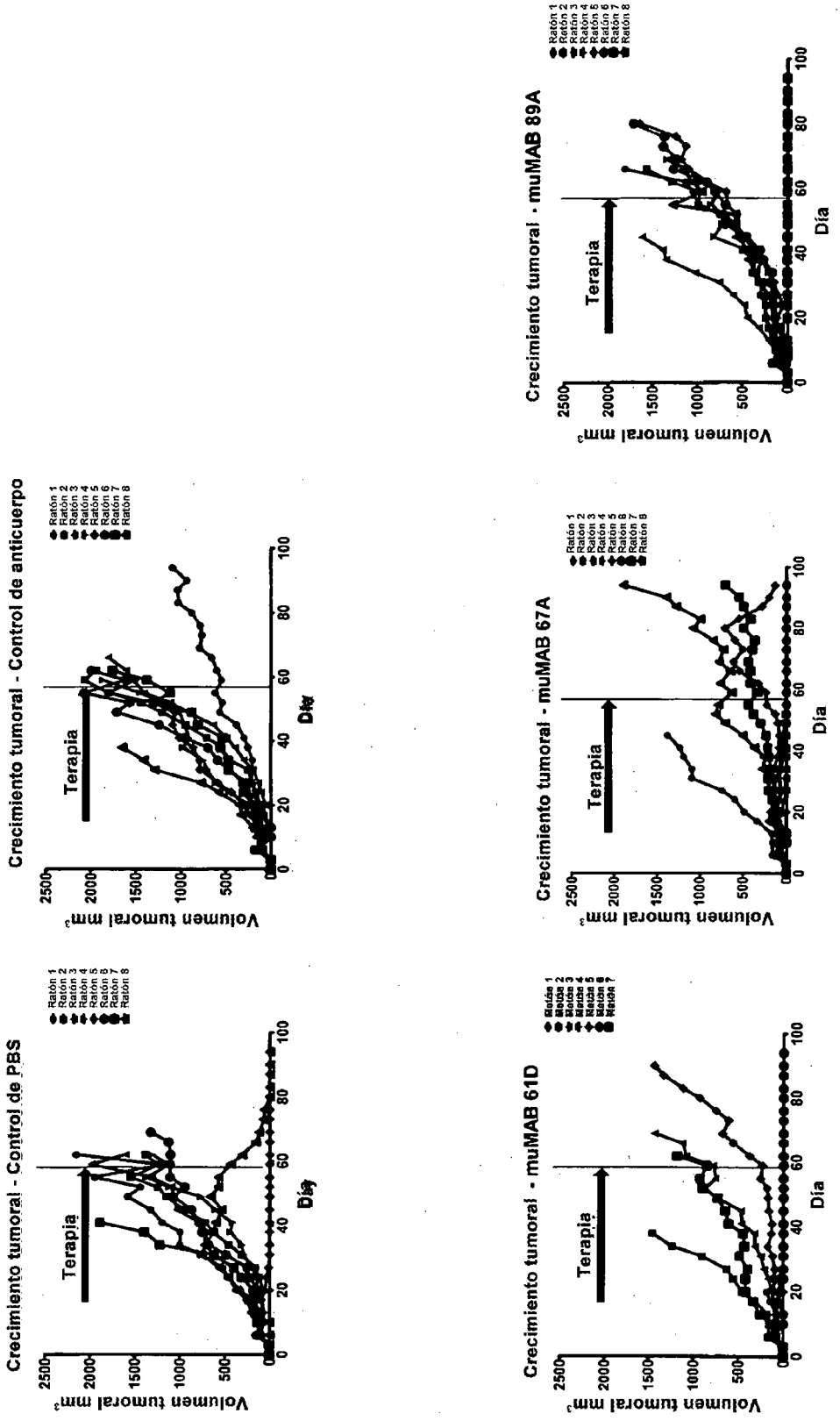

Crecimiento tumoral - Control de PBS
Crecimiento tumoral - Control de anticuerpo
Crecimiento tumoral - muMAB 61D
Crecimiento tumoral - muMAB 67A
Crecimiento tumoral - muMAB 89A
Terapia
Volumen tumoral mm³
Día
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8

Fig. 22

(B)

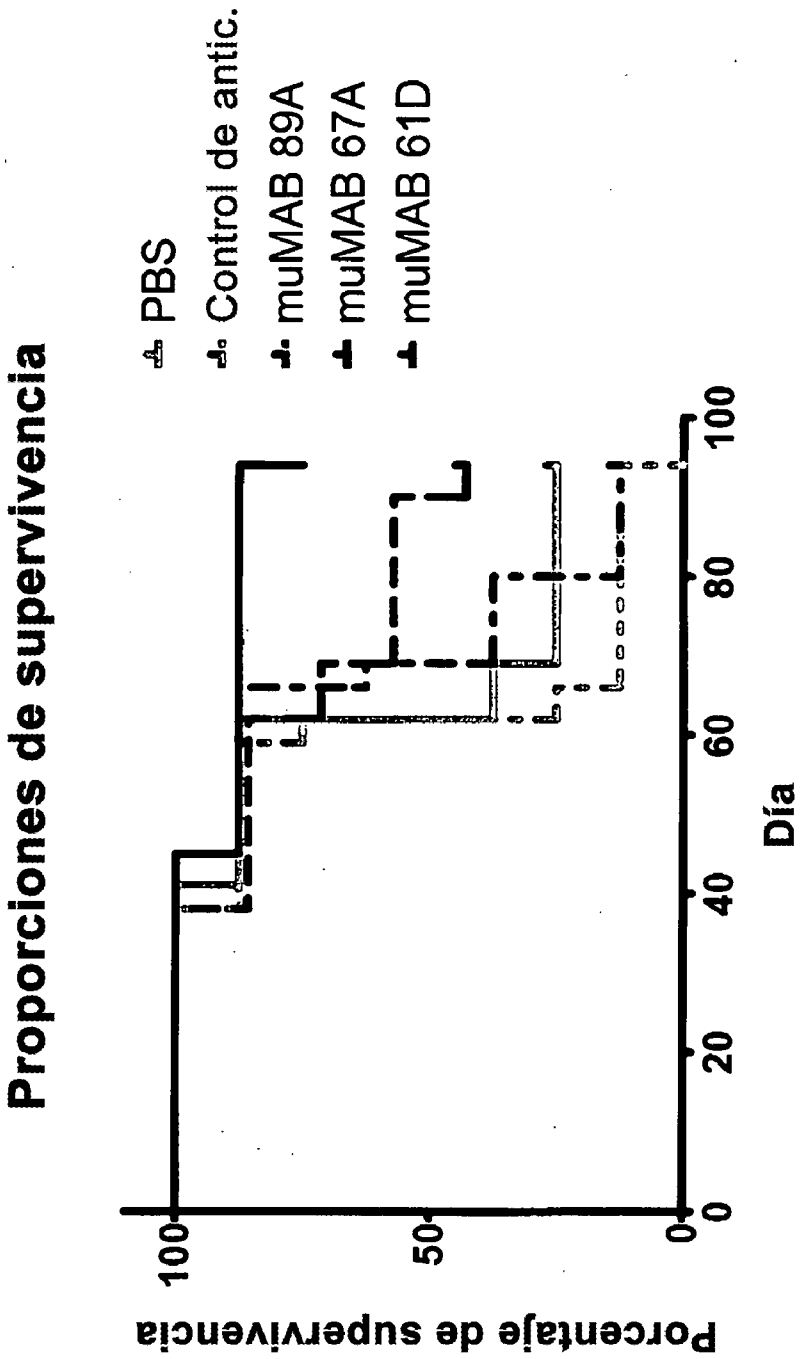

Proporciones de supervivencia
PBS
Control de antic.
muMAB 89A
muMAB 67A
muMAB 61D
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
20
40
60
80
100
Día

Fig. 23

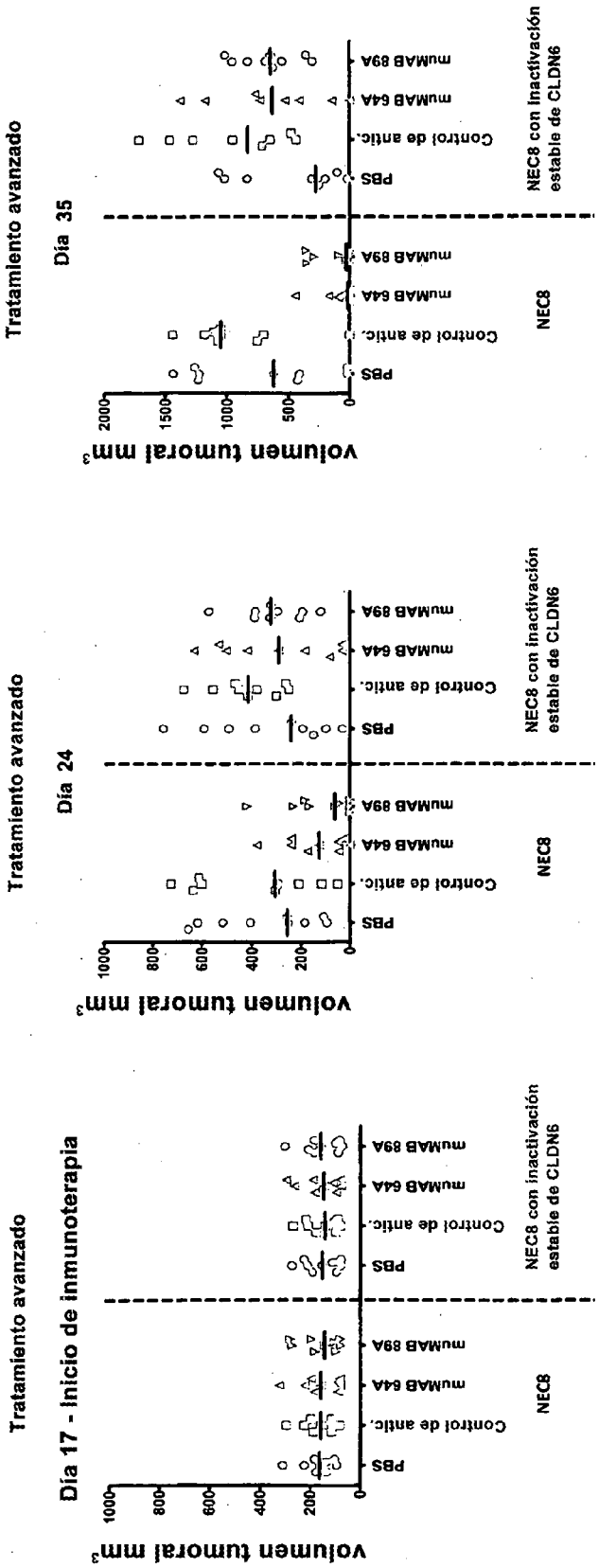

Tratamiento avanzado
Día 17 - Inicio de inmunoterapia
Volumen tumoral mm³
1000
800
600
400
200
0
PBS
Control de antic.
muMAB 64A
muMAB 89A
NEC8
NEC8 con inactivación estable de CLDN6
Tratamiento avanzado
Día 24
Volumen tumoral mm³
1000
800
600
400
200
0
PBS
Control de antic.
muMAB 64A
muMAB 89A
NEC8
NEC8 con inactivación estable de CLDN6
Tratamiento avanzado
Día 35
Volumen tumoral mm³
2000
1500
1000
500
0
PBS
Control de antic.
muMAB 64A
muMAB 89A
NEC8
NEC8 con inactivación estable de CLDN6

Fig. 24

		EC1 (aa 27-81)																																																				
		L	P	M	W	K	V	T	A	F	I	G	N	S	I	V	V	A	Q	V	V	W	E	G	L	W	M	S	C	V	V	Q	S	T	G	Q	M	Q	C	K	V	Y	D	S	L	L	A	L	P	Q	D	L	Q	A	A	R
Nombre		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
GT512quimAB	61D		X		X					■		■		■										X	X	X			X										X																	
GT512quimAB	64A		X		X					■		■		■										X	X	X			X										X																	
GT512quimAB	67A		X		X					■		■		■										X	X	X			X										X																	
GT512quimAB	89A		X		X					■		■		■	■									X	X	X			X										X																	
R&D			X		X																			X	X	X			X										X																	

		EC2 (aa 137-161)																								
		C	W	T	A	H	A	I	I	R	D	F	Y	N	P	L	V	A	E	A	Q	K	R	E	L	G
Nombre		137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
GT512quimAB	61D																									
GT512quimAB	64A																									
GT512quimAB	67A																									
GT512quimAB	89A																									
R&D																■										

- X transporte alterado a la membrana
- □ influencia nula sobre la unión de anticuerpo
- □ contribuye a la unión de anticuerpo
- ■ esencial para la unión a anticuerpo

Fig. 25

HCDR1 HCDR2 Sección 1

SEC ID nº			1 10 20 30 40 50 60 70 89
34	H61D	(1)	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTIDKSSSTAYMELLSLTSE
36	H64A	(1)	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSE
38	H67A	(1)	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGIIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSE
40	H89A	(1)	EVQLQQSRPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGSSYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSE
Consenso		(1)	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSE

HCDR3 Sección 2

			90 100 117
		(90)	DSAVYYCARDYGYVLDYWGQGTTLTVSS
	H61D	(90)	DSAVYYCARDYGYVLDYWGQGTTLTVSS
	H64A	(90)	DSAVYYCARDYGFVLDYWGQGTTLTVSS
	H67A	(90)	DSAVFYCARDFGYVLDYWGQGTTLTVSS
	H89A	(90)	DSAVYYCARDYGYVFDYWGQGTTLTVSS
	Consenso	(90)	DSAVYYCARDYGYVLDYWGQGTTLTVSS

Fig. 26

LCDR1 LCDR2 Sección 1

SEC ID nº			1 10 20 30 40 50 60 70 80
35	L61D	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYLHWFQQKPGTSPKLWVYSTSNLPSGVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ
39	L67A	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVAAEDAATYYCQQ
37	L64A	(1)	QIVLTQSPSIMSVSPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLCIYSTSNLASGVPARFSGRGSGTSYSLTISRVAAEDAATYYCQQ
41	L89A	(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVNYMHWFQLKPGTSPKLLIYSTSNLASGVPARFSGRGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ
Consenso		(1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQ

LCDR3 Sección 2

			90 107
		(90)	RSIYPPWTFGGGTKLEIK
	L61D	(90)	RSIYPPWTFGGGTKLEIK
	L67A	(90)	RSTYPPWTFGGGTKLEIK
	L64A	(90)	RSNYPPWTFGGGTKLEIK
	L89A	(90)	RHNYPPWTFGGGTKLEIK
	Consenso	(90)	RSNYPPWTFGGGTKLEIK

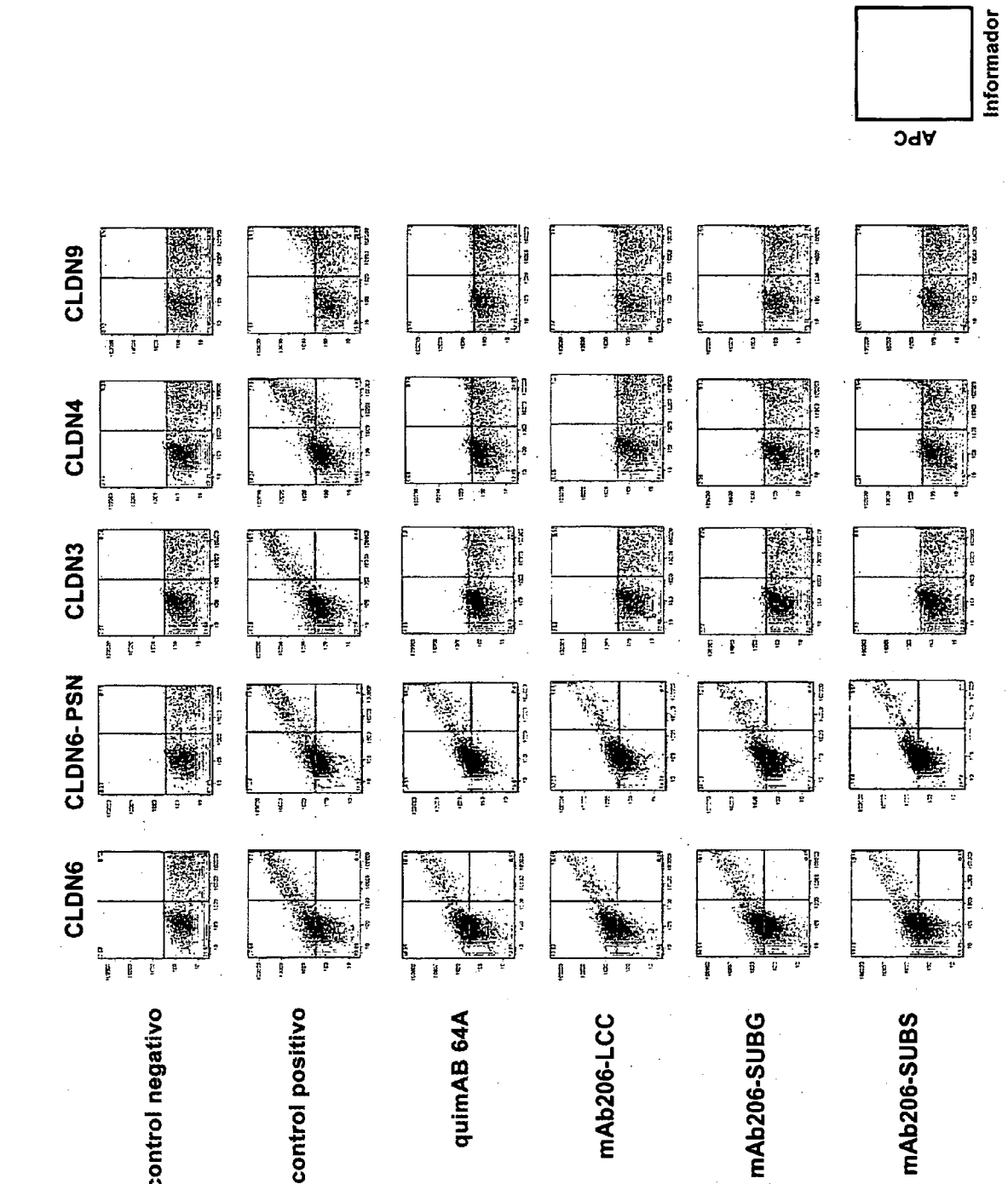


Fig. 27
CLDN6
CLDN6- PSN
CLDN3
CLDN4
CLDN9
control negativo
control positivo
quimAB 64A
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
APC
Informador

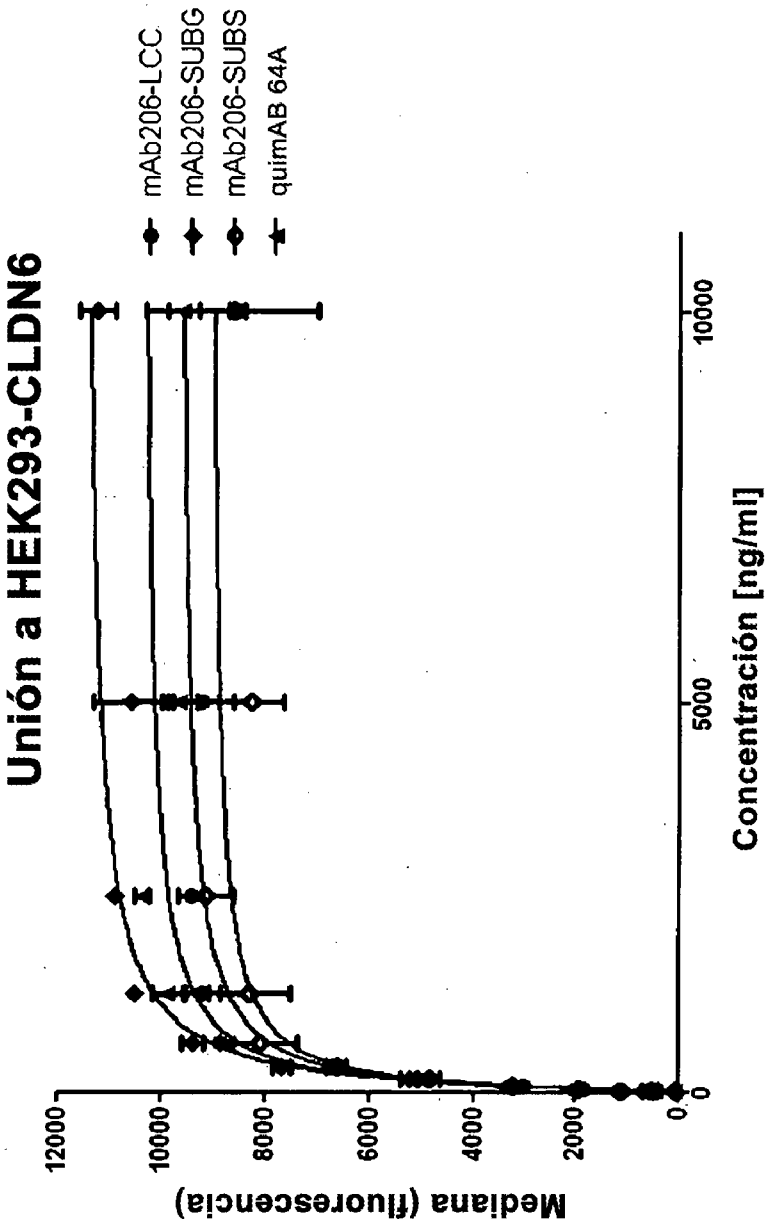

Unión a HEK293-CLDN6
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
quimAB 64A
Mediana (fluorescencia)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
5000
10000
Concentración [ng/ml]

Fig. 28

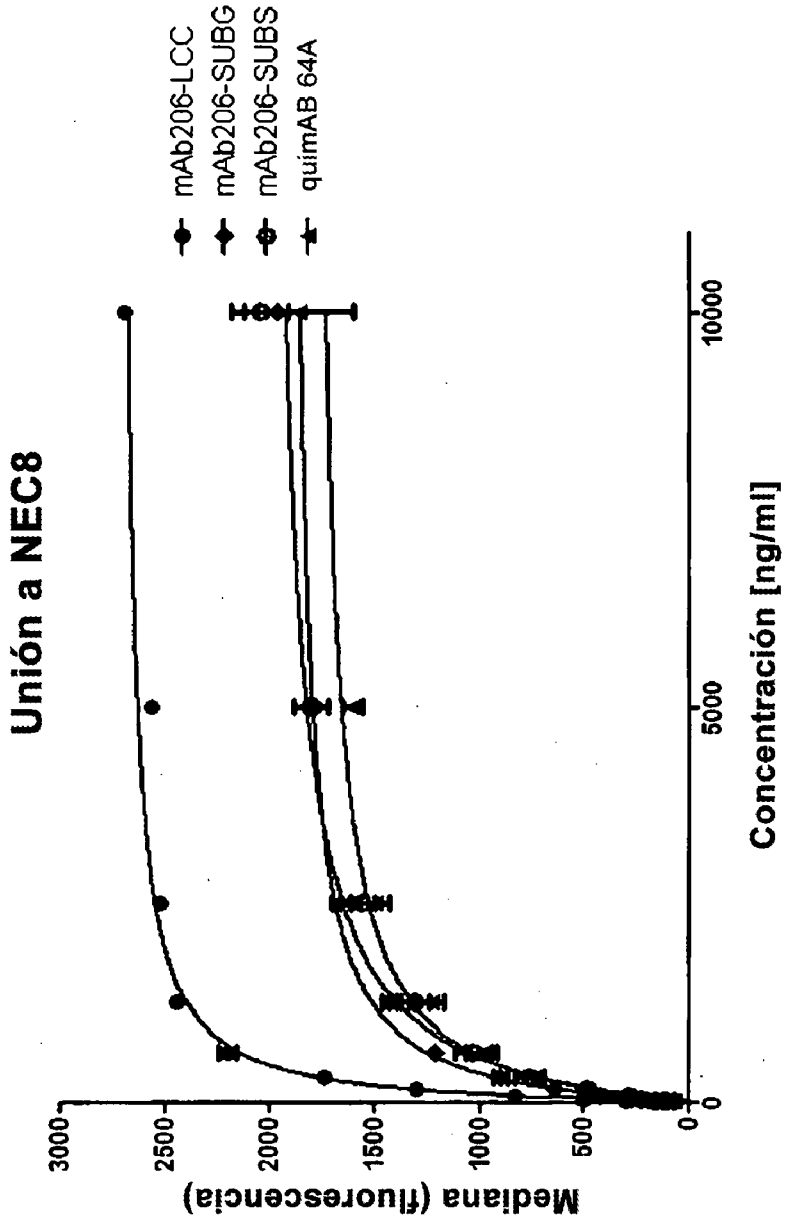

Unión a NEC8
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
quimAB 64A
Mediana (fluorescencia)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5000
10000
Concentración [ng/ml]

Fig. 29

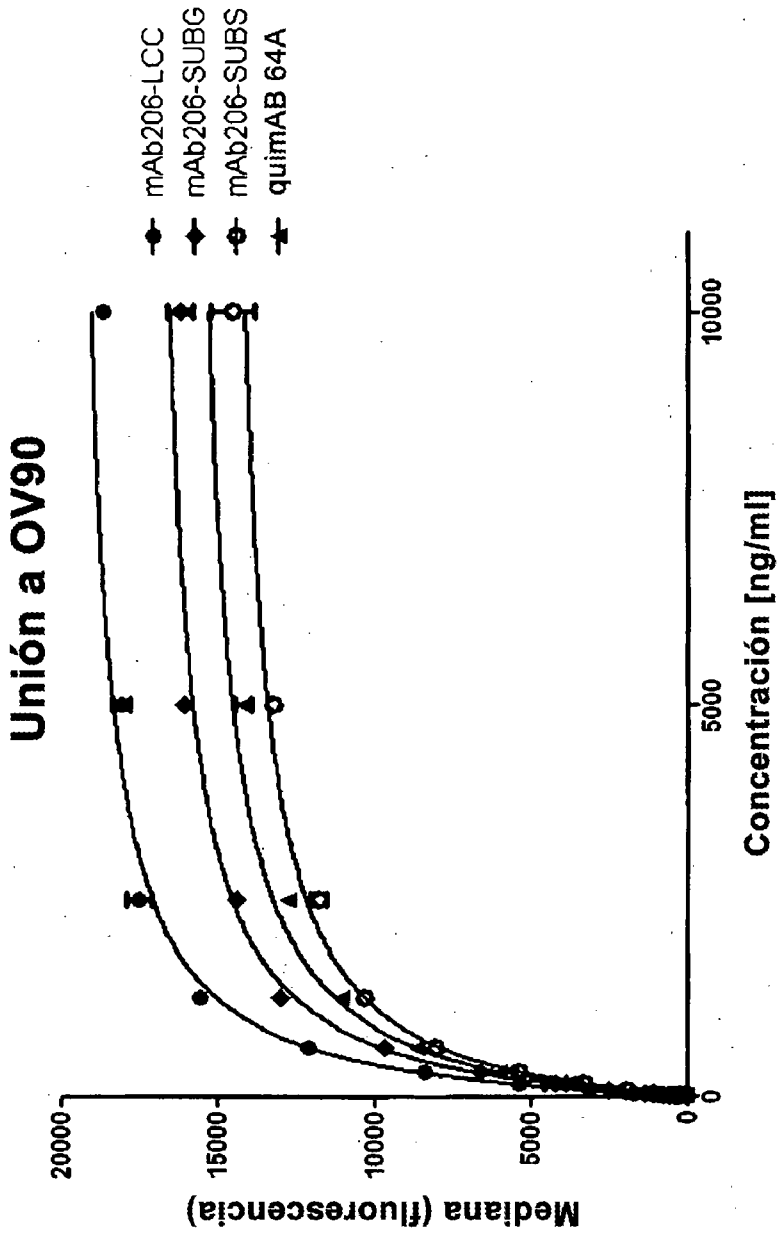
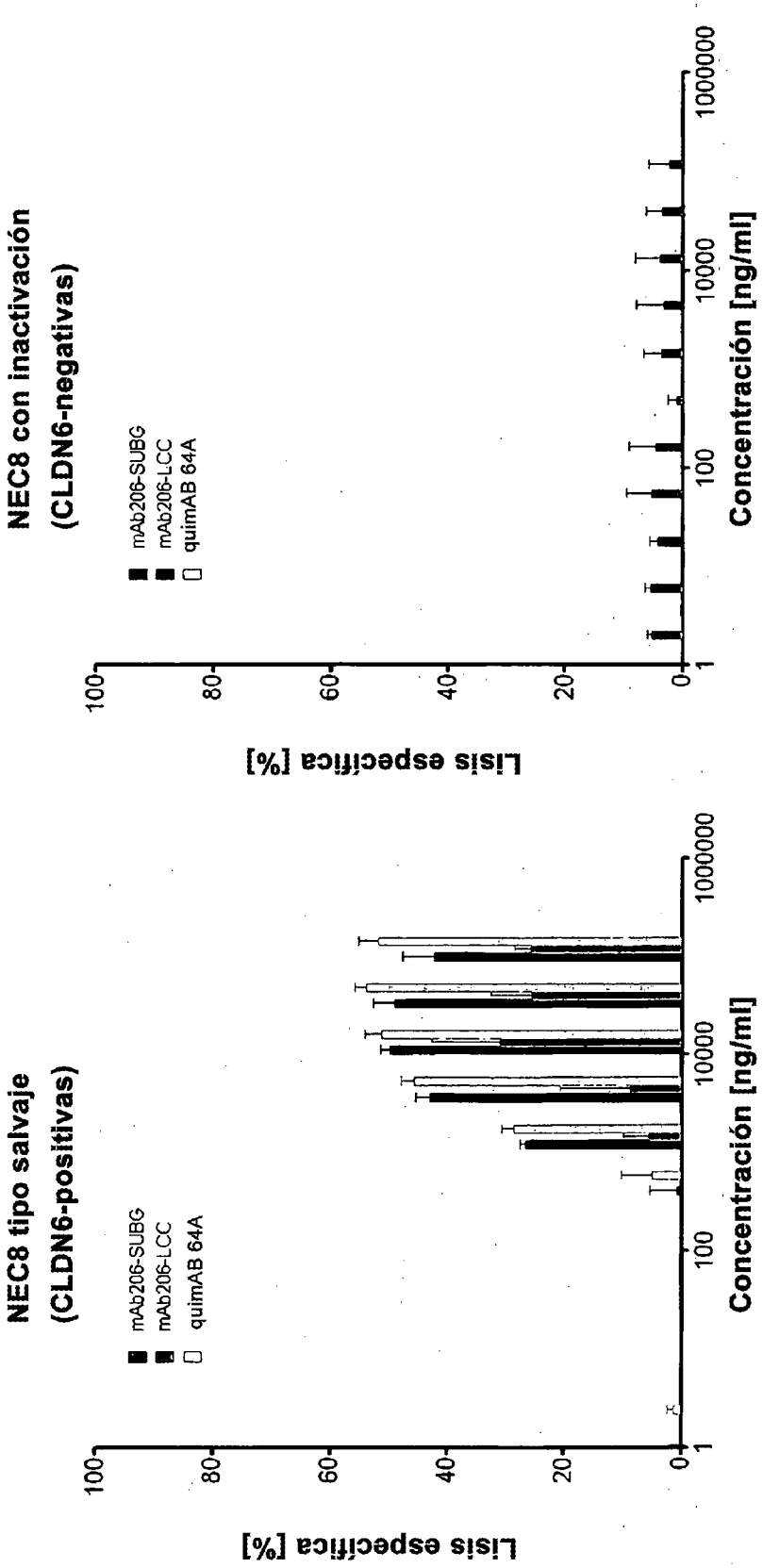

Unión a OV90
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
quimAB 64A
Mediana (fluorescencia)
20000
15000
10000
5000
0
0
5000
10000
Concentración [ng/ml]

Fig. 30

Fig. 31a


NEC8 tipo salvaje
(CLDN6-positivas)
mAb206-SUBG
mAb206-LCC
quimAB 64A
Lisis específica [%]
Concentración [ng/ml]
NEC8 con inactivación
(CLDN6-negativas)
mAb206-SUBG
mAb206-LCC
quimAB 64A
Lisis específica [%]
Concentración [ng/ml]

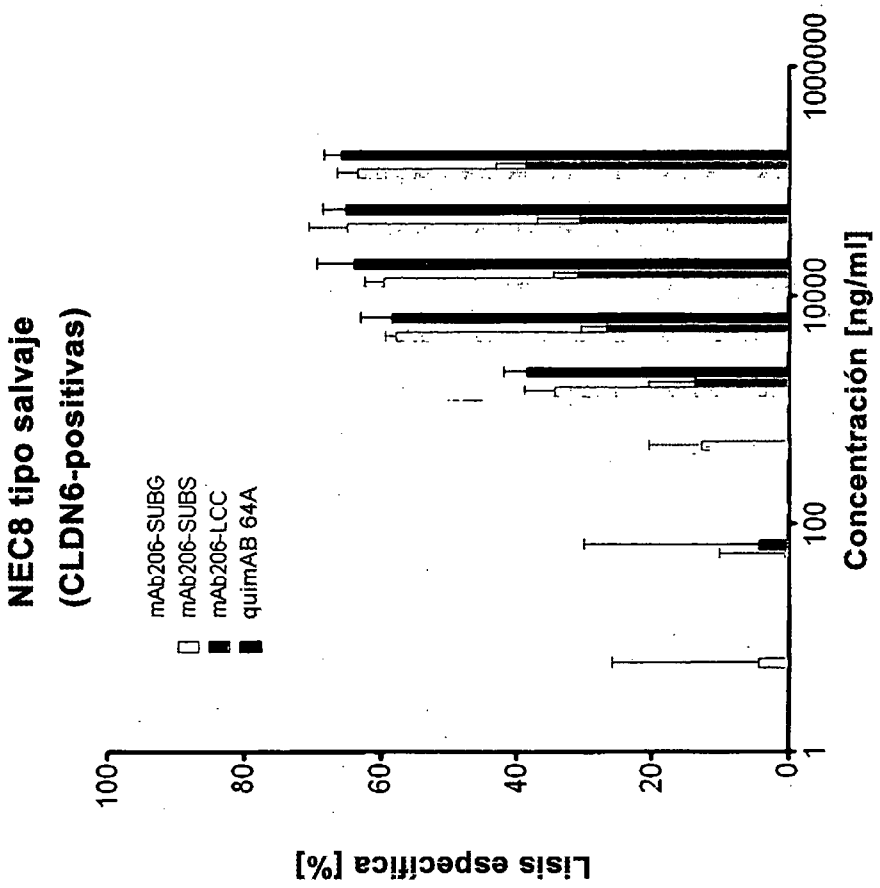

NEC8 tipo salvaje
(CLDN6-positivas)
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
mAb206-LCC
quimAB 64A
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]

Fig. 31b

Fig. 32a

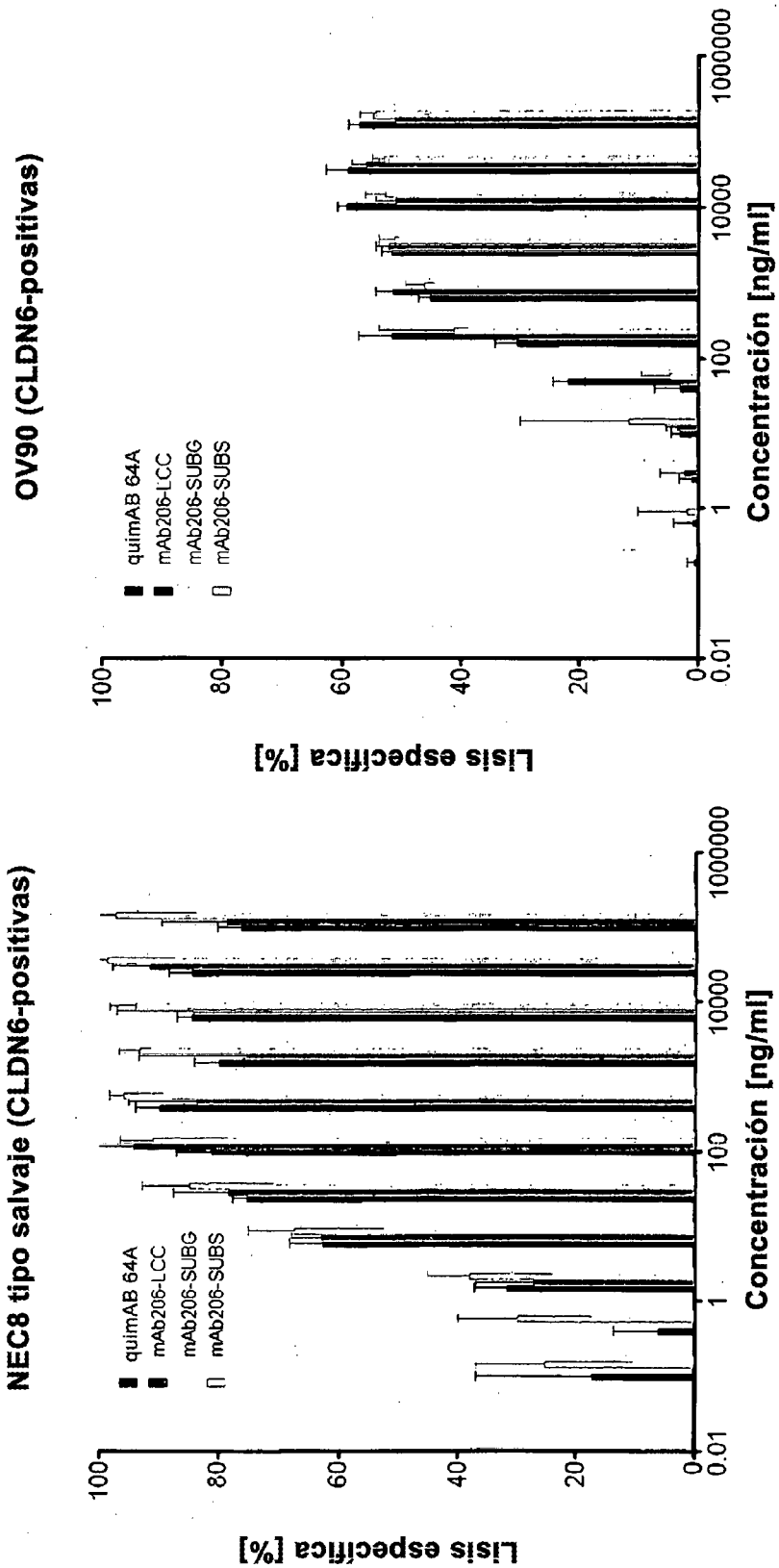

NEC8 tipo salvaje (CLDN6-positivas)
quimAB 64A
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
0.01
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]
OV90 (CLDN6-positivas)
quimAB 64A
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
Lisis específica [%]
100
80
60
40
20
0
0.01
1
100
10000
1000000
Concentración [ng/ml]

Fig. 32b

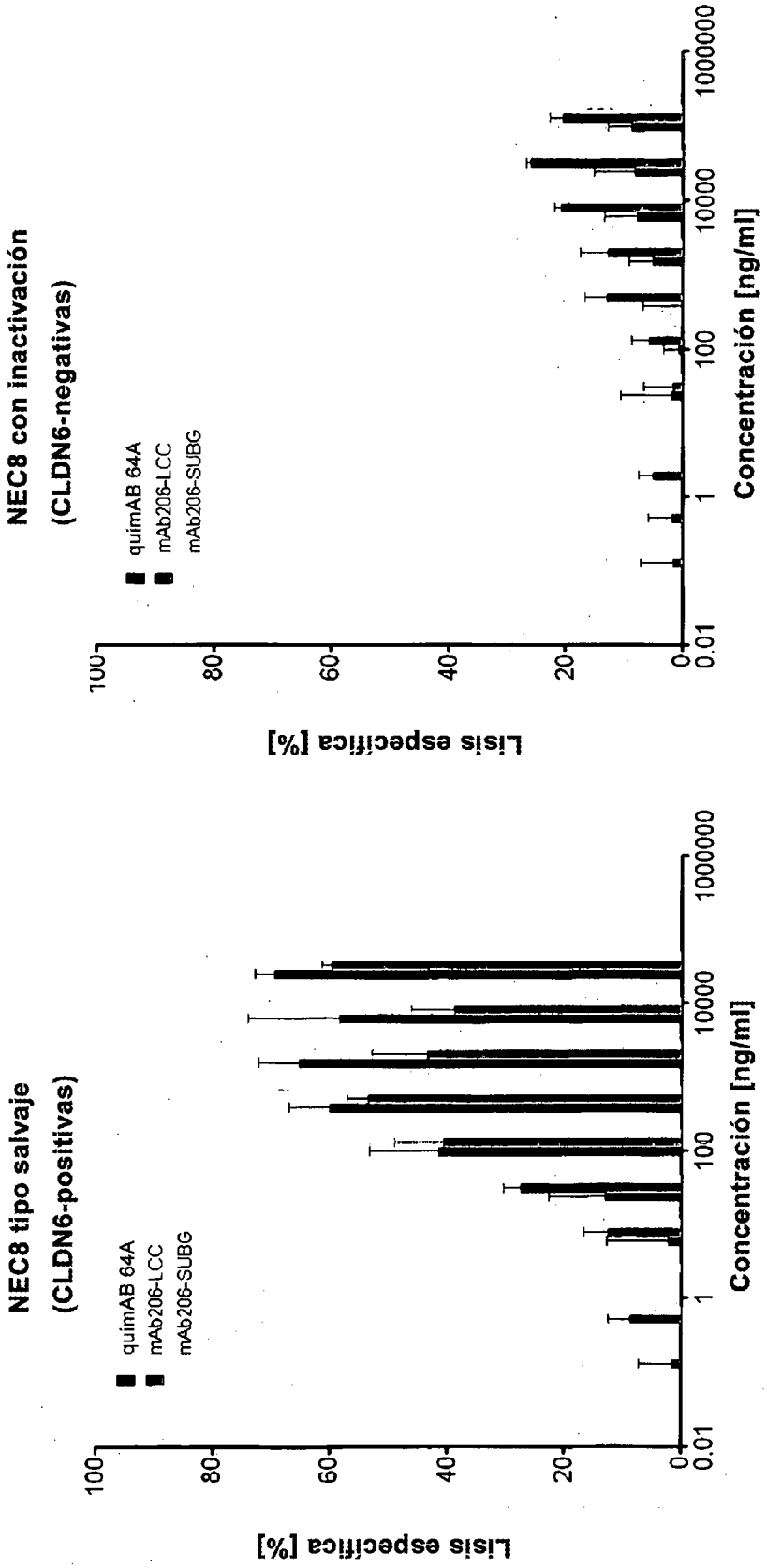

NEC8 con inactivación
(CLDN6-negativas)
quimAB 64A
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
Lisis específica [%]
Concentración [ng/ml]
NEC8 tipo salvaje
(CLDN6-positivas)
quimAB 64A
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
Lisis específica [%]
Concentración [ng/ml]

Fig. 33

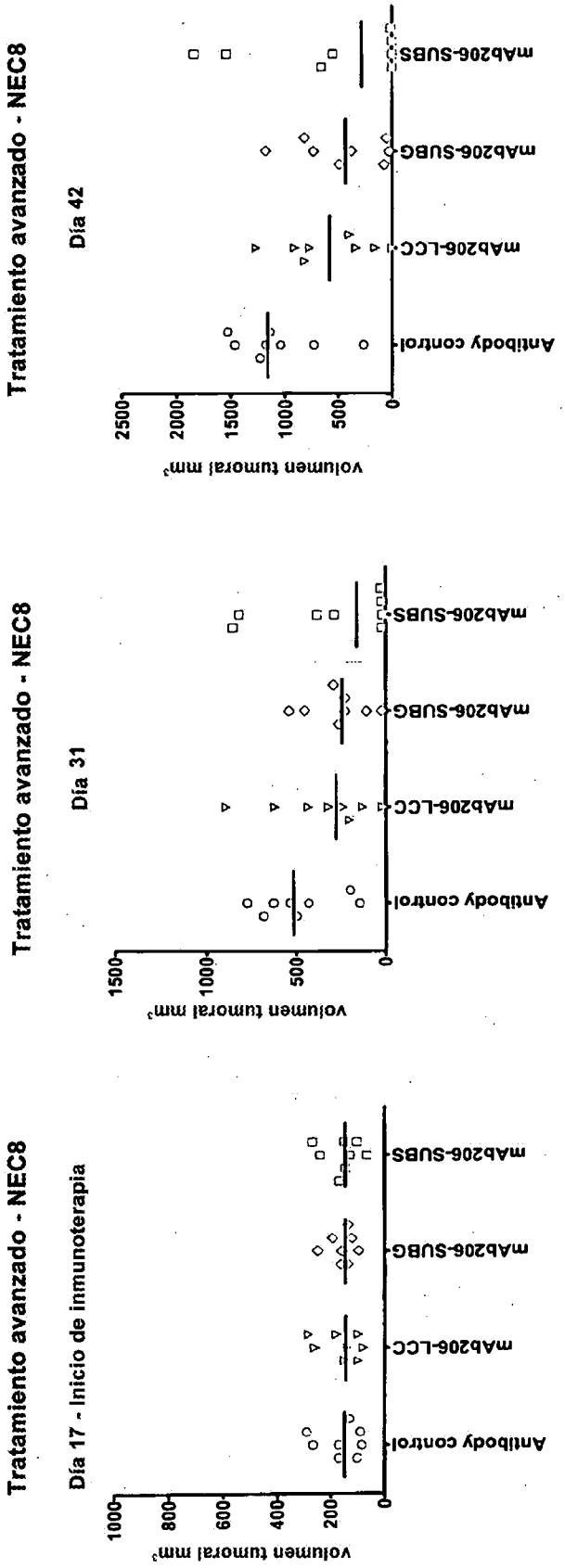

Tratamiento avanzado - NEC8
Día 17 - Inicio de inmunoterapia
Volumen tumoral mm³
1000
800
600
400
200
0
Antibody control
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
Tratamiento avanzado - NEC8
Día 31
Volumen tumoral mm³
1500
1000
500
0
Antibody control
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
Tratamiento avanzado - NEC8
Día 42
Volumen tumoral mm³
2500
2000
1500
1000
500
0
Antibody control
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS

Fig. 34a

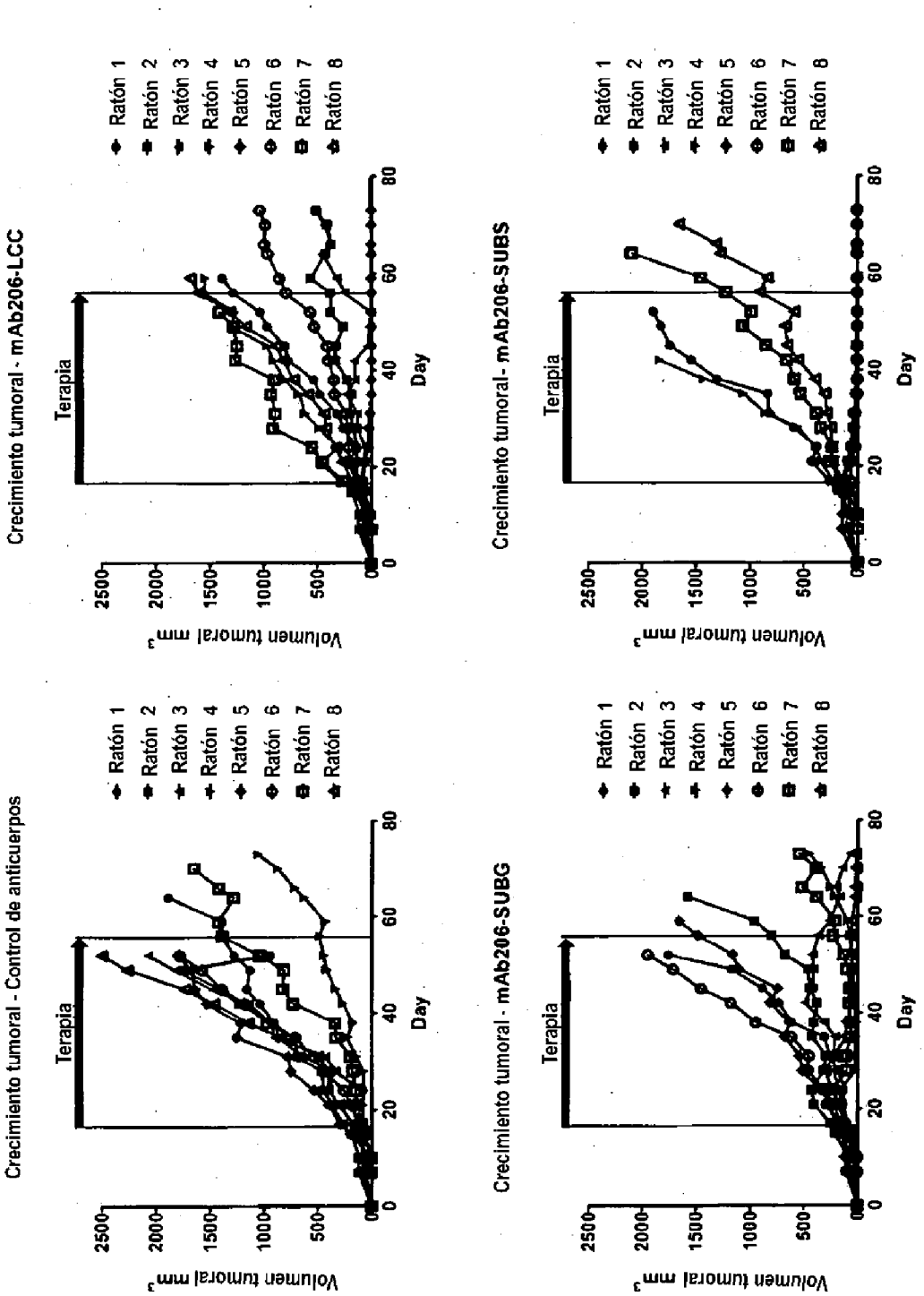

Crecimiento tumoral - Control de anticuerpos
Crecimiento tumoral - mAb206-LCC
Crecimiento tumoral - mAb206-SUBG
Crecimiento tumoral - mAb206-SUBS
Terapia
Volumen tumoral mm3
Day
0
500
1000
1500
2000
2500
20
40
60
80
Ratón 1
Ratón 2
Ratón 3
Ratón 4
Ratón 5
Ratón 6
Ratón 7
Ratón 8

Fig. 34b

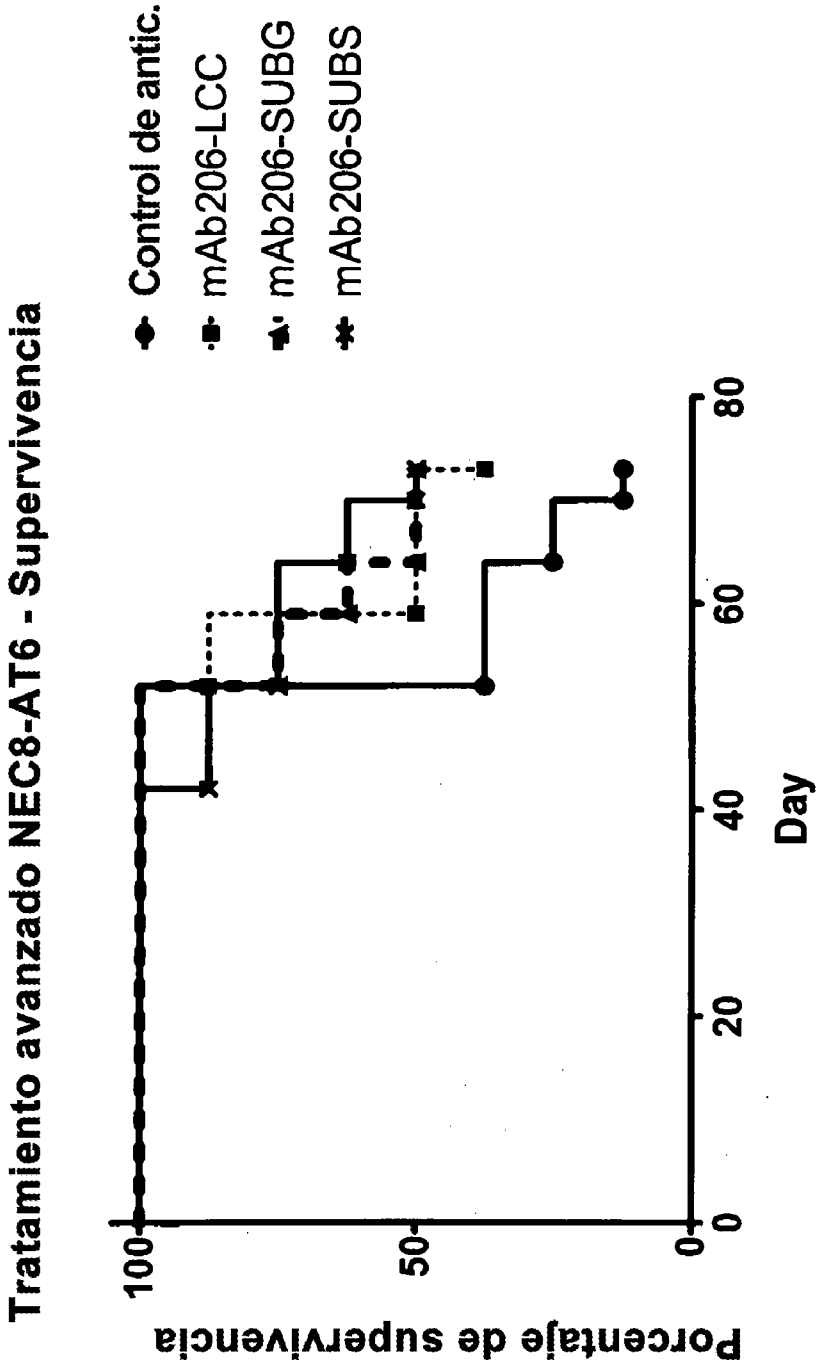

Tratamiento avanzado NEC8-AT6 - Supervivencia
Control de antic.
mAb206-LCC
mAb206-SUBG
mAb206-SUBS
Porcentaje de supervivencia
100
50
0
0
20
40
60
80
Day

Fig. 35

EC1 (aa 27-81)

	L	P	M	W	K	V	T	A	F	I	G	N	S	I	V	V	A	Q	V	V	W	E	G	L	W	M	S	C
Nombre	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
quimAB 64A		X		X					■		■		■										X	X	X			X
mAb206-LCC		X		X					■		■		■										X	X	X			X
mAb206-SUBG		X		X					■		■		■										X	X	X			X
mAb206-SUBS		X		X					■		■		■										X	X	X			X

	V	V	Q	S	T	G	Q	M	Q	C	K	V	Y	D	S	L	L	A	L	P	Q	D	L	Q	A	A	R
Nombre	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81
quimAB 64A										X																	
mAb206-LCC										X																	
mAb206-SUBG										X																	
mAb206-SUBS										X																	

EC2 (aa 137-161)

	C	W	T	A	H	A	I	I	R	D	F	Y	N	P	L	V	A	E	A	Q	K	R	E	L	G
Nombre	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
quimAB 64A																									
mAb206- LCC																									
mAb206- SUBG																									
mAb206- SUBS																									

X transporte alterado a la membrana
influencia nula sobre la unión de antic.
contribuye a la unión de anticiuerpo
■ esencial parala unión a anticuerpo

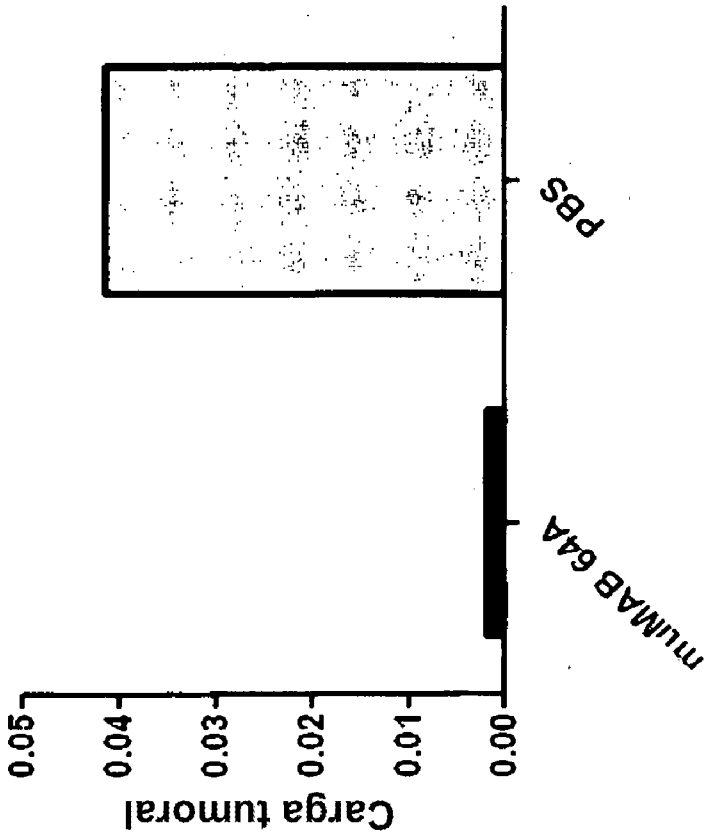


Fig. 36

Fig. 37

	mAb206-LCC	mAb206-SUBG	muMAB 64A
Tejidos de cáncer			
CA Ovar.	2/2	2/2	2/2
CA Testículo	1/1	1/1	4/4
Tejidos normales			
Mama	0/1	0/1	-
Colon	0/1	0/1	0/4
Duodeno	0/1	0/1	-
Vesícula biliar	0/1	0/1	-
Corazón	0/1	0/1	0/1
Riñón	0/1	0/1	0/4
Hígado	0/1	0/1	0/2
Pulmón	0/1	0/1	-
Nódulo linfático	0/1	0/1	-
Esófago	0/1	0/1	0/1
Ovario	0/1	0/1	-
Páncreas	0/1	0/1	0/2
Placenta	0/1	0/1	-
Próstata	0/1	0/1	0/2
Músculo esqu.	0/1	0/1	-
Bazo	0/1	0/1	-
Estómago	0/1	0/1	0/2
Testículo	0/4	0/4	0/2
Tubo	0/1	0/1	-
Tiroides	0/1	0/1	-
Útero	0/2	0/2	-