

CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO DIRIGIDO A LA CLAUDINA 18.2

ANTECEDENTES

[0001] Las claudinas, tal como la claudina 18.2, se consideran objetivos prometedores para la inmunoterapia contra el cáncer. Las claudinas son una familia de proteínas que forman los componentes importantes de las uniones celulares estrechas. Establecen una barrera paracelular que controla el flujo de moléculas entre las células. Las proteínas tienen un N-terminal y un C-terminal en el citoplasma. Diferentes claudinas se expresan en diferentes tejidos, su función alterada se ha unido con la formación de cánceres en los tejidos respectivos. La claudina-1 se expresa en el cáncer de colon, la claudina-18 se expresa en el cáncer de estómago y la claudina-10 se expresa en el carcinoma hepatocelular.

[0002] La claudina-18 tiene dos isoformas, la isoforma 1 y la isoforma 2. La isoforma 2 (claudina 18.2 o CLDN18.2) es un marcador de linaje celular altamente selectivo. La expresión de la claudina 18.2 en tejidos normales está estrictamente confinada a células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica, pero estaba ausente de la zona de células madre gástricas. La claudina 18.2 se retuvo en la transformación maligna y se expresó en una proporción significativa de cánceres gástricos primarios y sus metástasis. La activación ectópica frecuente de la claudina 18.2 también se encontró en tumores de páncreas, esófago, ovario y pulmón. Estos datos sugirieron que CLDN18.2 tiene un patrón de expresión altamente restringido en tejidos normales, con activación ectópica frecuente en una diversidad de cánceres humanos.

SUMARIO

[0003] En el presente documento se descubren anticuerpos anti-claudina 18.2 que se unen selectivamente a la claudina 18.2 de tipo natural y a un M149L mutante común, y no se unen a otras isoformas de claudina 18, tal como la claudina 18.1. En un descubrimiento sorprendente e inesperado, la

presente divulgación demuestra que estos anticuerpos son altamente eficaces para inducir la internalización de anticuerpos mediada por receptores, en particular cuando se comparan con IMAB362 (claudiximab), un anticuerpo anti-claudina 18.2 líder en desarrollo clínico. Por lo tanto, cuando se conjugan con una porción de fármaco, estos anticuerpos son capaces de administrar eficazmente el fármaco en las células efectoras, tal como las células cancerosas que sobreexpresan la proteína de la claudina 18.2.

[0004] La capacidad mucho mayor para inducir la internalización de anticuerpos mediada por receptores de los anticuerpos descritos en la presente puede atribuirse a la forma en que estos anticuerpos se unen a la proteína de la claudina 18.2. Como se demuestra en el **Ejemplo 14** y se ilustra en la **Figura 20**, los residuos de aminoácidos en la proteína de la claudina 18.2 que son importantes para la unión a los anticuerpos incluyen aquellos que son importantes para estabilizar la conformación de las horquillas extracelulares (p. ej., W30, L49, W50, C53, C63 y R80). Más importante aún, se contempla que los residuos que están involucrados en la unión a los anticuerpos incluyen N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62, que están ubicados entre las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$ de la primera horquilla extracelular, y Y169 y G172, que están en $\beta 5$ de la segunda horquilla extracelular. Por el contrario, se cree que los anticuerpos anti-claudina 18.2 conocidos solo se unen a una de las horquillas extracelulares.

[0005] De conformidad con una realización de la presente divulgación, se proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco, que comprende una porción de fármaco unido covalentemente a un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o el fragmento de este se une a la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ y la cadena $\beta 5$ de CLDN18.2. La horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ consiste en los residuos 45-63 de la SEQ ID NO:30 (NYQGLWRSCVRESSGFTEC), y la cadena $\beta 5$ consiste en los residuos 169-172 de la SEQ ID NO:30 (YTFG).

[0006] En algunas realizaciones, la relación entre el número de fracciones de fármaco y el número de anticuerpos o fragmentos es de 1:1 a 20:1. En algunas realizaciones, la relación es de 2:1 a 10:1. En algunas realizaciones, la relación es de 2:1 a 6:1. En algunas realizaciones, la relación es aproximadamente 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1 o 5:1.

[0007] En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de este no se une a $\beta 1$ y $\beta 2$, o se une a $\beta 1$ o $\beta 2$ con una afinidad que es al menos 10 veces menor que con la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ o la cadena $\beta 5$. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de este no se une a la proteína CLDN18.1 o se une a CLDN18.1 con una afinidad que es al menos 10 veces menor que a CLDN18.2.

[0008] En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de este se une al mutante CLDN18.2 M149L con una afinidad que es al menos el 1% de la afinidad con la proteína CLDN18.2 de tipo natural.

[0009] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62; y al menos un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en Y169 y G172, de la SEQ ID NO:30.

[0010] La porción del fármaco puede ser un agente citotóxico o citostático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, una toxina o similar. La porción del fármaco, una vez liberado en la célula cancerosa, puede inhibir la multiplicación de la célula cancerosa o provocar la apoptosis en la célula cancerosa. Los ejemplos de porciones de fármacos se seleccionan del grupo que consiste en DM1 (maitansina, N2'-desacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)- o N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimidocaproil-monometilauristatina-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-(2-tiazolil)etil]amino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-

(9CI)-L-valinamida), mc-MMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoil-(α R, β R,2S)- β -metoxi- α -metil-2-pirrolidinopropanoil-L-fenilalanina) y mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimidocaproil-ValcCit-(p-aminobenciloxicarbonilo)-monometilauristatina E o N-[[[4-[[N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-L-valil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil]amino]fenil]metoxi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]-1-pirrolidinil]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida). DM1 es un derivado del inhibidor de tubulina maitansina mientras que MMAD, MMAE y MMAF son derivados de auristatina.

[0011] También se proporcionan métodos y usos para el tratamiento de enfermedades y afecciones. En una realización, se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente el conjugado de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012] La Figura 1 muestra que los sueros de ratón de todos los ratones después de la inmunización con DNA han reaccionado a una titulación alta con células HEK293 transfectadas con CLD 18A2 mediante citometría de flujo, CLD 18A1 como control negativo.

[0013] La Figura 2 muestra que los sobrenadantes de hibridoma pueden unirse a células HEK293 transfectadas con CLD18A2 humana mediante ELISA celular o citometría de flujo.

[0014] La Figura 3 muestra que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a células MKN45 transfectadas con CLD18A2 humana mediante citometría de flujo con EC50 alto, en comparación con el anticuerpo de referencia positivo.

[0015] **La Figura 4** muestra que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a las células SU620 que expresan endógenamente a la CLD18A2 humana con la mutación M149L mediante citometría de flujo con EC50 alto, mientras que el anticuerpo de referencia no lo hizo.

[0016] **La Figura 5** muestra que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a células HEK293 transfectadas con CLD18A2 de ratón mediante citometría de flujo con EC50 alto.

[0017] **La Figura 6** muestra que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a las células HEK293 transfectadas con CLD18A2 de macaco cangrejero mediante citometría de flujo con EC50 alto.

[0018] **La Figura 7** muestra que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a células HEK293 transfectadas con CLD18A2 humana mediante citometría de flujo con EC50 alto.

[0019] **La Figura 8** muestra que los anticuerpos quiméricos pueden unirse a células MKN45 transfectadas con CLD18A2 humana mediante citometría de flujo con EC50 alto, en comparación con el anticuerpo de referencia positivo.

[0020] **La Figura 9** muestra que los anticuerpos quiméricos no pueden unirse a las células MKN45 transfectadas con CLD18A1 humana mediante citometría de flujo.

[0021] **La Figura 10** muestra que los anticuerpos humanizados pueden unirse a las células MKN45 transfectadas con CLD18A2 humana mediante citometría de flujo con EC50 alto, en comparación con el anticuerpo de referencia positivo.

[0022] **La Figura 11** muestra que los anticuerpos humanizados no pueden unirse a las células MKN45 transfectadas con CLD18A1 humana mediante citometría de flujo.

[0023] **La Figura 12** muestra que los anticuerpos humanizados con mutación de CDR pueden unirse a células MKN45 transfectadas con CLD18A2

humana mediante citometría de flujo con EC50 alto, en comparación con el anticuerpo de referencia positivo.

[0024] **La Figura 13** muestra que los anticuerpos humanizados con mutación CDR no pueden unirse a las células MKN45 transfectadas con CLD18A1 humana mediante citometría de flujo.

[0025] **La Figura 14** muestra que las variantes sin riesgos tenían una potente unión a la superficie celular CLD18A2.

[0026] **La Figura 15** muestra que ciertas mutaciones de CLD18A2 tienen un efecto importante sobre la unión de los anticuerpos indicados a las células HEK293 transfectadas con estos mutantes, lo que sugiere que estos residuos de aminoácidos constituyen al menos parte del epítipo.

[0027] **La Figura 16** muestra que los anticuerpos 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 tenían una unión superior en células CHO-K1 altas y bajas en la claudina 18.2, en comparación con 175D10.

[0028] **La Figura 17** muestra los potentes resultados de las pruebas ADCC de 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 utilizando el anticuerpo 175D10 como referencia.

[0029] **La Figura 18** muestra que las versiones S239D/I332E del 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 superaron a la contraparte 175D10 en los ensayos ADCC.

[0030] **La Figura 19** muestra que 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 también tenían mejores efectos ADCP que 175D10.

[0031] **La Figura 20** ilustra las estructuras 3D y de motivos de las proteínas claudina.

[0032] **La Figura 21** muestra los resultados de internalización de los anticuerpos quiméricos probados en comparación con el anticuerpo de referencia IMAB362 en células CHO que expresan claudina 18.2.

[0033] **La Figura 22** muestra los resultados de la internalización de los anticuerpos humanizados probados en comparación con el anticuerpo de referencia IMAB362 en células CHO que expresan claudina 18.2.

[0034] **La Figura 23** muestra los resultados de internalización de los anticuerpos humanizados probados en comparación con el anticuerpo de referencia IMAB362 en células MKN45 que expresan claudina 18.2.

[0035] **La Figura 24** muestra las afinidades de unión de los anticuerpos y sus conjugados farmacológicos.

[0036] **La Figura 25A-C** muestran la toxicidad celular de los conjugados anticuerpo-MMAE analizados tras la internalización en transfectantes DAN-G, NUGC o SCG-7901.

[0037] **La Figura 26** muestra la toxicidad celular de los conjugados anticuerpo-MMAE analizados tras la internalización en SNU620 que expresa endógenamente la claudina 18.2 humana.

[0038] **La Figura 27** compara el conjugado de anticuerpo-fármaco con el anticuerpo solo para reducir el crecimiento tumoral en animales de prueba.

[0039] **La Figura 28** muestra los efectos de reducción tumoral promedio o individual del conjugado anticuerpo-fármaco.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0040] Cabe señalar que los términos “un” o “una” se refieren a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que “un anticuerpo” representa uno o más anticuerpos. Como tal, los términos “un” (o “uno”), “uno o más” y “al menos uno” se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

[0041] Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” pretende abarcar un “polipéptido” en singular, así como “polipéptidos” en plural, y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) unidos linealmente por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término “polipéptido” se refiere a cualquier cadena o

cadena de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por lo tanto, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, “proteína”, “cadena de aminoácidos” o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos en la definición de “polipéptido”, y el término “polipéptido” se puede usar en lugar de cualquiera de estos términos o indistintamente con cualquiera de ellos. El término “polipéptido” también tiene por objeto hacer referencia a los productos de modificaciones postexpresión del polipéptido, que incluye, a mero título enunciativo, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos que no ocurren naturalmente. Un polipéptido puede ser derivado de una fuente biológica natural o producidos por tecnología recombinante, pero que no se traduce necesariamente de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede ser generado de cualquier manera, incluida la síntesis química.

[0042] El término “aislado”, conforme se lo utiliza en el presente documento, con respecto a células, ácidos nucleicos, tales como DNA o RNA, se refiere a moléculas separadas de otros DNA o RNA, respectivamente, que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. El término “aislado” como se usa en el presente documento, también se refiere a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de DNA recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Además, se entiende que un “ácido nucleico aislado” incluye fragmentos de ácido nucleico que no se encuentran naturalmente como fragmentos y no se encontrarían en el estado natural. El término “aislado” también se usa en el presente documento para referirse a células o polipéptidos que se aíslan de otras proteínas o tejidos celulares. Los polipéptidos aislados pretenden abarcar polipéptidos tanto purificados como recombinantes.

[0043] Tal como se usa en el presente documento, el término “recombinante” en lo que respecta a los polipéptidos o polinucleótidos se refiere a una forma del polipéptido o polinucleótido que no existe de forma natural, un ejemplo no limitativo del cual se puede crear mediante la combinación de polinucleótidos o polipéptidos que normalmente no se producirían juntos.

[0044] “Homología” o “identidad” o “similitud” se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear con fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. El grado de homología entre las secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas que comparten las secuencias. Una secuencia “no relacionada” o “no homóloga” comparte menos de 40% de identidad, aunque, preferentemente, menos de 25% de identidad, con una de las secuencias de la presente divulgación.

[0045] Un polinucleótido o una región polinucleotídica (o un polipéptido o una región polipeptídica) que tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%) de “identidad de secuencia” con otra secuencia significa que, cuando se alinea, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son iguales al comparar las dos secuencias. El alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Ausubel *et al.* eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Preferentemente, los parámetros predeterminados se utilizan para la alineación. Un programa de alineación es BLAST, que utiliza parámetros predeterminados. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP, que utilizan los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambos; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de

datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS traducciones + SwissProtein + Spupdate + PIR. Los polinucleótidos biológicamente equivalentes son aquellos que tienen el porcentaje de homología especificado anteriormente y que codifican un polipéptido que tiene la misma actividad biológica o una similar.

[0046] El término “un ácido nucleico o polinucleótido equivalente” se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico o complemento de este. Se pretende que un homólogo de un ácido nucleico bicatenario incluya ácidos nucleicos que tengan una secuencia de nucleótidos que tenga un cierto grado de homología con o con el complemento de este. En un aspecto, los homólogos de ácidos nucleicos son capaces de hibridarse con el ácido nucleico o el complemento de este. Asimismo, “un polipéptido equivalente” se refiere a un polipéptido que tiene un cierto grado de homología, o identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia. En algunos aspectos, la identidad de secuencia es al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. En algunos aspectos, el polipéptido o polinucleótido equivalente tiene una, dos, tres, cuatro o cinco adiciones, deleciones, sustituciones y sus combinaciones en comparación con el polipéptido o polinucleótido de referencia. En algunos aspectos, la secuencia equivalente conserva la actividad (p. ej., unión al epítipo) o estructura (p. ej., puente salino) de la secuencia de referencia.

[0047] Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de diferente “rigurosidad”. En general, una reacción de hibridación de baja rigurosidad se lleva a cabo a aproximadamente 40 °C en aproximadamente 10 × SSC o una solución de fuerza iónica/temperatura equivalente. Una hibridación de rigurosidad moderada se realiza típicamente a aproximadamente 50 °C en aproximadamente 6 × SSC, y una reacción de hibridación de alta rigurosidad generalmente se realiza a aproximadamente

60 °C en aproximadamente $1 \times \text{SSC}$. Las reacciones de hibridación también se pueden realizar en “condiciones fisiológicas” que son bien conocidas por los expertos con capacidades de la técnica. Un ejemplo no limitativo de una afección fisiológica es la temperatura, fuerza iónica, pH y concentración de Mg^{2+} que normalmente se encuentra en una célula.

[0048] Un polinucleótido está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases de nucleótidos: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); y uracilo (U) por timina cuando el polinucleótido es RNA. Por lo tanto, el término “secuencia de polinucleótidos” es la representación alfabética de una molécula de polinucleótidos. Esta representación alfabética puede ingresarse en bases de datos en una computadora que tenga una unidad central de procesamiento y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homología. El término “polimorfismo” se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o parte de este. Una parte de un gen del que hay al menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina “región polimórfica de un gen”. Una región polimórfica puede ser un solo nucleótido, cuya identidad difiere en diferentes alelos.

[0049] Los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de estos. Los polinucleótidos pueden tener una estructura tridimensional y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o no. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia, RNA ribosómico, ribozimas, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, DNA aislado de cualquier secuencia, RNA aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender

nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus nucleótidos análogos. De haberlas, se pueden impartir modificaciones a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polinucleótido. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede ser modificado adicionalmente luego de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcado. El término también se refiere a moléculas bicatenarias y monocatenarias. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta divulgación que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria y cada uno de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o predichas para formar la forma bicatenaria.

[0050] El término “codificar”, aplicado a polinucleótidos, se refiere a un polinucleótido que se dice que “codifica” un polipéptido si, en su estado original o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, puede transcribirse y/o traducirse para producir el mRNA del polipéptido y/o un fragmento de este. La hebra antisentido es el complemento de este ácido nucleico, y la secuencia de codificación puede deducirse de ella.

[0051] Como se usa en el presente documento, un “anticuerpo” o “polipéptido de unión a antígeno” se refiere a un polipéptido o un complejo polipeptídico que reconoce específicamente y se une a un antígeno. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo y cualquier fragmento de unión a antígeno o una sola cadena de este. Por lo tanto, el término “anticuerpo” incluye cualquier proteína o molécula que contiene péptido que comprende al menos una parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene actividad biológica de unión al antígeno. Ejemplos de tales incluyen, a mero título enunciativo, una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de esta, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera,

un marco región (FR), o cualquier parte de esta, o al menos una parte de una proteína de unión.

[0052] Los términos “fragmento de anticuerpo” o “fragmento de unión a antígeno”, como se usan en el presente documento, son una porción de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. El término “fragmento de anticuerpo” incluye aptámeros, spiegelmers y diacuerpos. El término “fragmento de anticuerpo” también incluye cualquier proteína sintética o diseñada genéticamente que actúa como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo.

[0053] Un “fragmento variable de cadena única” o “ $scFv$ ” se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y cadenas ligeras (V_L) de inmunoglobulinas. En algunos aspectos, las regiones están conectadas con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector puede ser rico en glicina para la flexibilidad, así como en serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el N-terminal de V_H con el C-terminal de V_L , o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del conector. Las moléculas $ScFv$ son conocidas en la técnica y se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. 5,892,019.

[0054] El término anticuerpo abarca varias clases amplias de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (p. ej., α_1 - α_4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅, etc. están bien caracterizados y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones

modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la materia en vista de la presente divulgación y, en consecuencia, están dentro del alcance de la presente divulgación. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, la siguiente discusión generalmente se dirigirá a la clase de moléculas de inmunoglobulina IgG. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos con un peso molecular de aproximadamente 23.000 dalton y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53.000 a 70.000. Las cuatro cadenas suelen estar unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" donde las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

[0055] Los anticuerpos, polipéptidos de unión a antígeno, variantes o derivados de estos de la divulgación incluyen, a mero título enunciativo, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítomos, p. ej., Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs unidos por enlaces disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VK o VH, fragmentos producidos por una colección de expresión Fab y antiidiotípicos (anti-Id) anticuerpos (incluidos, p. ej., anticuerpos anti-Id para anticuerpos LIGHT divulgados en el presente documento). Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la divulgación pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

[0056] Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida a una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas entre sí de forma covalente, y las porciones de la "cola" de las dos cadenas pesadas están

unidas entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, B células o células hospedadoras diseñadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el C-terminal en la parte inferior de cada cadena.

[0057] Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variable” se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de la cadena tanto ligera (VK) como pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CK) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se alejan más del sitio de unión al antígeno o del terminal amino del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CK en realidad comprenden el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

[0058] Como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a los epítopos de los antígenos. Es decir, el dominio VK y el dominio VH, o subconjunto de regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VK (es decir, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3). En ciertas ocasiones, p. ej., ciertas moléculas de

inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas según inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir únicamente en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, p. ej., Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993).

[0059] En los anticuerpos naturales, las seis “regiones determinantes de la complementariedad” o “CDR” presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias cortas no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el dominio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume sus tres configuraciones dimensionales en un ambiente acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, denominados regiones “estructurales”, muestran una menor variabilidad intermolecular. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una conformación de hoja β y las CDR forman horquillas que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja β . Así, las regiones marco actúan formando un andamiaje que permite colocar las CDR en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo afín. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones flanqueantes, respectivamente, pueden identificarse fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto con capacidades de la técnica, ya que se han definido con precisión (véase “Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico”, Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); and Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)).

[0060] En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta dentro de la técnica, la definición del término tal como se usa en el presente documento pretende incluir todos esos significados a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el

uso del término “región determinante de complementariedad” (“CDR”) para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) y por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Las definiciones de CDR según Kabat y Chothia incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de este está destinada a estar dentro del alcance del término como se define y usa en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR según se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen en la siguiente tabla como comparación. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0061] Kabat *et al.* también definió un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto con capacidades de la técnica puede asignar sin ambigüedades este sistema de “numeración de Kabat” a cualquier secuencia de dominio variable,

sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

[0062] Además de la tabla anterior, el sistema numérico de Kabat describe las regiones CDR de la siguiente manera: CDR-H1 comienza aproximadamente en el aminoácido 31 (es decir, aproximadamente 9 residuos después del primer residuo de cisteína), incluye aproximadamente 5 a 7 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-H2 comienza en el decimoquinto residuo después del extremo de CDR-H1, incluye aproximadamente 16 a 19 aminoácidos y termina en el siguiente residuo de arginina o lisina. CDR-H3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo de aminoácidos después del extremo de CDR-H2; incluye 3 a 25 aminoácidos; y termina en la secuencia W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido. CDR-L1 comienza aproximadamente en el residuo 24 (es decir, después de un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 10 a 17 residuos; y termina en el siguiente residuo de triptófano. CDR-L2 comienza aproximadamente en el decimosexto residuo después del extremo de CDR-L1 e incluye aproximadamente 7 residuos. CDR-L3 comienza aproximadamente en el trigésimo tercer residuo después del extremo de CDR-L2 (es decir, siguiendo un residuo de cisteína); incluye aproximadamente 7 a 11 residuos y termina en la secuencia F o W-G-X-G, donde X es cualquier aminoácido.

[0063] Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier origen animal, incluidos pájaros y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, de conejo, de cabra, de cobayo, de camello, de llama, de caballo o de pollo. En otra realización, la región variable puede tener un origen condriactoides (p. ej., de tiburones).

[0064] Como se usa en el presente documento, el término “región constante de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento de este. Por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno para usar en la divulgación puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la divulgación comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un anticuerpo para usar en la divulgación puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (p. ej., todo o parte de un dominio CH2). Como se establece anteriormente, un experto normal con capacidades de la técnica entenderá que la región constante de la cadena pesada puede modificarse de modo que varíe en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

[0065] La región constante de cadena pesada de un anticuerpo descrito en el presente documento puede derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una región constante de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG₁ y una región bisagra derivada de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una región constante de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₃. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra

quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG₁ y, en parte, de una molécula de IgG₄.

[0066] Como se usa en el presente documento, el término “región constante de cadena ligera” incluye secuencias de aminoácidos derivadas de la cadena ligera del anticuerpo. Preferentemente, la región constante de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio kappa constante o un dominio lambda constante.

[0067] Un “par de cadena ligera-cadena pesada” se refiere a la colección de una cadena ligera y una cadena pesada que pueden formar un dímero a través de un enlace disulfuro entre el dominio CL de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

[0068] Como se indicó anteriormente, las estructuras de las subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Como se usa en el presente documento, el término “dominio VH” incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término “dominio CH1” incluye el primer dominio de región constante (más amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y es amino terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

[0069] Como se usa en el presente documento, el término “dominio CH2” incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, p. ej., desde aproximadamente el residuo 244 hasta el residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración Kabat; y residuos 231 a 340, sistema de numeración de la EU; véase Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983). El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N

entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

[0070] Como se usa en el presente documento, el término “región bisagra” incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite que las dos regiones de unión a antígeno N-terminal se muevan de forma independiente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al.*, *J. inmunol* 161:4083 (1998)).

[0071] Como se usa en el presente documento, el término “enlace disulfuro” incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o un puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG naturales, las regiones CH1 y CK están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la EU).

[0072] Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo quimérico” significará cualquier anticuerpo donde la región o el sitio inmunorreactivo se obtiene o se deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada de conformidad con la presente divulgación) se obtiene de una segunda especie. En determinadas realizaciones, la región o el sitio de unión objetivo será de una fuente no humana (p. ej., ratón o primate) y la región constante es humana.

[0073] Como se usa en el presente documento, el “porcentaje de humanización” se calcula determinando el número de diferencias de aminoácidos del marco (es decir, diferencia no CDR) entre el dominio

humanizado y el dominio de la línea germinal, restando ese número del número total de aminoácidos y luego dividiéndolo por el número total de aminoácidos y multiplicándolo por 100.

[0074] Por “se une específicamente” o “tiene especificidad para”, generalmente se entiende que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo se “une específicamente” a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno, más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término “especificidad” se usa en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo “A” tiene una especificidad más alta para un epítipo dado que el anticuerpo “B”, o se puede decir que el anticuerpo “A” se une al epítipo “C” con una especificidad más alta que la que tiene para el epítipo “D” relacionado.

[0075] Como se usa en el presente documento, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como la progresión del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, a mero título enunciativo, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la

afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno debe prevenirse.

[0076] Por “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero” se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para quien se desea un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y zoológicos, deportes o animales domésticos tales como perros, gatos, cobayos, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, etc.

[0077] Como se usa en el presente documento, frases tales como “a un paciente que necesita tratamiento” o “un sujeto que necesita tratamiento” incluye sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo o composición de la presente divulgación utilizada, p. ej., para la detección, para un procedimiento de diagnóstico y/o para el tratamiento.

Anticuerpos y fragmentos de la anti-claudina 18.2

[0078] La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-claudina 18.2 con alta afinidad tanto por la claudina 18.2 de tipo natural como por un mutante común, M149L (la célula SU620 que expresa endógenamente esta mutación). Hasta donde saben los inventores, todas las proteínas anti-claudina 18.2 conocidas en la actualidad no se unen a este mutante. Los anticuerpos de la presente divulgación, por lo tanto, tienen la ventaja única de ser capaces de dirigirse tanto a la proteína claudina 18.2 mutante M149L como a la de tipo natural. Esta ventaja es importante porque una parte significativa de los pacientes con cáncer poseen esta mutación común. También vale la pena señalar que los anticuerpos de la presente divulgación no se unen a la otra isoforma de claudina 18, claudina 18.1 (o se une a claudina 18.1 con una afinidad mucho menor).

[0079] Los anticuerpos y fragmentos de la presente divulgación exhibieron propiedades superiores incluso cuando se usaba un candidato clínico

como referencia. 175D10 (IMAB362; claudiximab) se encuentra probándose en la actualidad en ensayos clínicos de fase III para el tratamiento del adenocarcinoma de la unión gastroesofágica y gástrica. Los presentes anticuerpos y fragmentos no solo mostraron actividades de unión más fuertes, sino que también exhibieron actividades ADCC y ADCP más altas en varias condiciones diferentes, en comparación con 175D10.

[0080] También es importante que la presente divulgación demuestre que estos anticuerpos son muy eficaces para inducir la internalización de anticuerpos mediada por receptores, incluso cuando se comparan con IMAB362. Se contempla que la capacidad muy aumentada para inducir la internalización de anticuerpos mediada por receptores de los anticuerpos actualmente divulgados puede atribuirse a cómo estos anticuerpos se unen a la proteína claudina 18.2. Como se demuestra en el **Ejemplo 14** y se ilustra en la **Figura 20**, los residuos de aminoácidos en la proteína de la claudina 18.2 que son importantes para la unión a los anticuerpos incluyen aquellos que son importantes para estabilizar la conformación de las horquillas extracelulares (p. ej., W30, L49, W50, C53, C63 y R80). W30, L49 y W50 son parte del motivo de consenso W-LW-C-C que ayuda a estabilizar la conformación de la horquilla 1. C53 y C63 forman un enlace disulfuro entre cadenas beta. R80 es probablemente importante para mantener la interacción entre moléculas paralelas de claudina 18.2 en la superficie celular, o para estabilizar la conformación de la horquilla 1.

[0081] También son importantes para la unión del anticuerpo los residuos N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60, E62, Y169 y G172. Entre ellos, N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62 se ubican dentro de la cadena $\beta 3$, o a través de C63 en la cadena $\beta 4$. Esta región, que consiste en los residuos 45 a 63 de la SEQ ID NO:30 (NYQGLWRSCVRESSGFTEC), se denomina “horquilla $\beta 3$ a $\beta 4$ ”, que forma parte de la primera horquilla extracelular (horquilla 1) de claudina 18.2. Y169 y G172, por el contrario, forman parte de la

cadena $\beta 5$ (residuos 169-172 de la SEQ ID NO:30; YTFG) de la segunda horquilla extracelular (horquilla 2).

[0082] Se contempla que el gran aumento de la actividad de los anticuerpos descritos actualmente para inducir la internalización de anticuerpos mediada por receptores se debe a su capacidad para unirse a residuos tanto en la horquilla $\beta 3$ a $\beta 4$ como en la cadena $\beta 5$. En este contexto, se cree que los anticuerpos anti-claudina 18.2 conocidos solo se unen a una de las horquillas.

[0083] Los datos experimentales también muestran que los anticuerpos descritos actualmente tienen una mayor especificidad de unión y ADCC y ADCP mejorados en comparación con los conocidos.

Secuencia de la claudina 18.2 humana

Nombre	Secuencia (SEQ ID NO:30)
Claudina 18.2 humana (NP_001002026)	1 MAVTACQGLG FVSLIGIAG IIAATCMD<u>QW</u> ST<u>Q</u>DLYNNPV TAVF<u>NYQGLW</u> ----- 51 RSC<u>VRESSGF</u> <u>TE</u>CRGYFTLL GLPAMLQAVR ALMIVGIVLG AIGLLVSIFA ----- Horquilla $\beta 3$-$\beta 4$ 101 LKCIRIGSME DSAKANMTLT SGIMFIVSGL CAIAGVSVFA NMLVTNFWMS 151 TANMYTGMGG MVQTVQTR<u>Y</u>T F<u>G</u>AALFVGWV AGGLTLIGGV MMCIACRGLA -- -- B5

	201 PEETNYKAVS YHASGHSVAY KPGGFKASTG FGSNTKNKKI YDGGARTEDE 251 VQSYPSKHDY V
--	--

[0084] De conformidad con una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este se une tanto a la primera horquilla extracelular como a la segunda horquilla extracelular de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de este se une tanto a la horquilla $\beta 3$ - $\beta 4$ como a la cadena $\beta 5$ de CLDN18.2.

[0085] De conformidad con otra realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento se une además a un mutante M149L de la proteína CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento no se une a una proteína claudina 18.1 (CLDN18.1) de tipo natural humana, o no se une a CLDN18.1 con una afinidad mayor que aproximadamente el 1% de la afinidad a la proteína CLDN18.2 de tipo natural.

[0086] La afinidad de unión de un anticuerpo o fragmento a una proteína se puede medir con muchos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden medir ensayos sin células con proteínas CLDN18.1 o CLDN18.2 independientes. Preferentemente, sin embargo, la medición se realiza con la proteína CLDN18.1 o CLDN18.2 en una superficie celular que imita el entorno de unión real. Dichos ensayos de unión se ejemplifican adecuadamente en los ejemplos experimentales.

[0087] En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de estos tienen una afinidad de unión al mutante M149L que es al menos 1%, o

alternativamente al menos 0,001%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de la afinidad a la proteína CLDN18.2 de tipo natural.

[0088] En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de estos no se unen a CLDN18.1 humana. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de estos, en comparación con la unión a CLDN18.2, tienen una unión mucho más débil a CLDN18.1 humana, por ejemplo, no superior al 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% o 0,001%, sin limitación.

[0089] Conforme se describe arriba, los anticuerpos y fragmentos de estos de la presente divulgación se unen a la proteína claudina 18.2 en un epítipo que es diferente de los anticuerpos conocidos (véase la Figura 4; al menos el anticuerpo de referencia interactúa con M149 mientras que los actualmente descritos no lo hacen). En una realización, por lo tanto, se proporciona un anticuerpo, o fragmento de este, que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde la unión entre el anticuerpo o fragmento de este y la proteína CLDN18.2 de tipo natural contiene residuos de aminoácidos que comprenden al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62; y al menos un residuo de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en Y169 y G172, de la proteína CLDN18.2 de tipo natural.

[0090] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a N45 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a Y46 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a G48 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a L49 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a W50 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a C53 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une

a V54 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a R55 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a E56 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a E58 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a F60 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a E62 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a C63 de CLDN18.2.

[0091] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos dos residuos de aminoácidos seleccionados de N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos tres residuos de aminoácidos seleccionados de N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos cuatro residuos de aminoácidos seleccionados de N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos cinco residuos de aminoácidos seleccionados de N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62.

[0092] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos Y169 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos G172 de CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a al menos dos residuos de aminoácidos seleccionados de Y169 y G172 de CLDN18.2.

[0093] En algunas realizaciones, la unión implica residuos de aminoácidos que comprenden W30; dos, tres, cuatro, cinco o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60 y E62; y al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y169 y G172, de la proteína CLDN18.2 de tipo natural. En algunas realizaciones, la unión implica residuos de aminoácidos que

comprenden W30, N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60, E62 e Y169 de la proteína CLDN18.2 de tipo natural.

[0094] Los enlaces más débiles a estos aminoácidos en CLDN18.2 pueden compararse con los otros aminoácidos, tales como G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56. En algunas realizaciones, la comparación es con la unión del mismo aminoácido a 175D10. Por ejemplo, la unión del anticuerpo o fragmento de la presente divulgación es más débil que la de 175D10 (tarjeta IMGT/2Dstructure-DB n.º: 10473) a al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco D28, Q33, N38, V43, G59 y V79, o todos ellos.

[0095] En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este no se une a M149L de la proteína CLDN18.2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este se une a un mutante M149L de la proteína CLDN18.2.

[0096] De conformidad con una realización de la presente divulgación, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que incluye los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera con las regiones CDR como se muestra en las combinaciones de CDR de la **Tabla A**.

Tabla A. Combinaciones de CDR de anticuerpos analizados**(numeración de Kabat)**

° de co mb .	C omplet o	CDRL 1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)	CDRH 1 (SEQ ID NO:)	CDRH 2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
	6 4G11B 4	KSSQ SLLNSGNQ RNYLT (208)	ASTR ES (227)	V NDYFY PFT (42)	Q YLLE (234)	EINPG NGGSNYNE KFKG (255)	IY YGNSFA Y (281)
	6 5G8B8	KSSQ SLLNSGNL KNYLT (209)	ASTR ES (227)	V Q NVYIYP FT (43)	YGV S (235)	VIWG DGNTIYHSA LKS (256)	Q GLYGH MDY (282)
	5 6E8F10 F4	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	ASTR ES (227)	V Q NDYYF PFT (44)	FGM N (236)	FISGG SNTIHYLDT VKG (257)	LA LGNAMD Y (283)
	5 4A2C4	KSSQ SLLNGGNQ KNYLA (211)	ASTR ES (228)	C Q NDLYY PWT (45)	NAM N (237)	RIRSK SNNYATYYA DSVKD (258)	GA YYGNSK AFDY (284)
	5 4A2C4'	KSSQ SLLNGGNQ KNYLA (211)	ASTR ES (228)	C Q NDLYY PWT (45)	NAM YLLE (234)	EINPG NGGSNYNE KFKG (255)	IY YGNSFA Y (281)

	5 4A2C4"	KSSQ SLLNGGNQ KNYLA (211)	ASTR ES (228)	Q NDLYY PWT (45)	Y YSIH (238)	YINPS TIYTNYNQK FKY (259)	EG YGRGNA MDY (285)
	4 4F6B11	KSNQ SLLNSGNQ KKYLT (212)	ASTR ES (227)	Q NGYSY PFT (46)	Y YGM S (239)	TFSY GDSHNYYS DSVKG (260)	FG RGNTMD Y (286)
	1 5C2B7	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	ASTR ES (227)	Q NNYYF PLT (47)	Y YGM N (240)	WINA NTGEPTYAE EFKG (261)	LT RGNSFD Y (287)
	2 0F1E10	KSSQ SLFNNGGNQ RNYLT (213)	ASTR ES (227)	Q NVYSY PLT (48)	Y YGM N (241)	WIST NTGEPTYAE EFKG (262)	LV RGNSFD F (288)
0	7 2C1B6 A3	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	ASSR ES (229)	Q NDYIYP YT (8)	Y YPIE (242)	NFHP YNDDTKYNE KFKG (263)	RA YGYPPYA MDY (289)
1	5 8G2C2	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	AFTR ES (230)	Q NSYSY PFT (49)	Y YLIE (243)	VINPG RSGTNYNE KFKG (264)	TR YGGNAM DY (290)
2	1 01C4F1 2	KSSQ SLLNSGNQ RNYLT (208)	SSTR DS (231)	Q NNFIYP LT (50)	Y YGV H (244)	VIWA GGSTNYDS ALMS (265)	SL YGNSLD S (291)

3	1 03A10B 2	RSS MSLFNSGN QKSYLS (214)	V ASTR DS (232)	H NDYIYP LT (51)	FGV H (245)	VIWA GGSTNYNS ALMS (266)	SL YGNSFD Y (292)
4	7 8E8G9 G6	RSIQ SLLNSGNQ KNYLS (215)	V ASTR ES (227)	Q NSYSY PFT (49)	YGV H (244)	VIWA GGRTNYNS ALMS (267)	DR YGGNSL DY (293)
5	4 F11E2	RSSQ SLLNSGNR KNYLT (216)	V ASTR ES (227)	Q NAYSY PFT (13)	FGM H (246)	YITSG NSPIYFTDT VKG (268)	SS YYGNSM DY (294)
6	1 0G7G1 1	KSSQ SLFNSGNQ RNYLT (213)	V ASTR ES (227)	Q NAYYF PFT (19)	YGV H (247)	VMLS DGNTVYNS SLKS (269)	HK AYGNAM DY (295)
7	1 2F1F4	KSSQ SLFNSGNQ RNYLT (213)	V SSTR ES (233)	Q NNYYY PFT (52)	YGV S (248)	VIWG DGNTNYQS ALRS (270)	VG RGNAMD H (296)
8	7 8C10B 6G4	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	F ASSR ES (229)	Q NDYIYP YT (8)	YGV S (248)	VIRGD GNTNYQSAL RS (271)	VG RGNAMD H (296)
9	1 19G11 D9	RSTQ SLFNSGNQ KNYLT (217)	V ASTR ES (227)	Q NAYYY PLT (53)	FLM H (249)	YINPY NDGTKYSEK FKG (272)	LD YGNAMD Y (297)

0	1 13G12 E5E6	KPSQ SLLNSGNQ KNYLA (218)	ASTR ES (227)	V Q NAYFY PCT (54)	YGV H (250)	VIWT GGNTDYNP ALIP (273)	NG YYGNAM DY (298)
1	1 16A8B7	RSTQ SLFNNSGNQ RNYLT (219)	ASTR ES (227)	V Q NAYYY PLT (53)	FLM H (249)	YINPY NDGTTYSEK FKG (272)	LD YGNAMD Y (297)
2	1 05F7G 12	KSSQ SLLNSGNQ KNYLA (220)	ASTR ES (227)	V Q NAYFY PCT (54)	YGV H (250)	VIWT GGNTDYNP ALIP (273)	NG YYGNAM DY (298)
3	8 4E9E12	KSSQ SVFNNSGNQ KNYLT (221)	ASTR ES (227)	V Q NDYYF PLT (55)	GYF W (251)	YISYD GSNNYNPSL KN (274)	FR FFAY (299)
4	1 03F4D4	RSSQ SLLNGGNQ KNYLT (222)	ASTR ES (227)	V Q NAYFY PFT (56)	YSIH (238)	YINPS TIYTNYNQK FKY (259)	EG YGRGNA MDY (285)
5	1 10C12 B6	RSTQ SLFNNSGNQ RNYLT (219)	ASTR ES (227)	V Q NAYYY PLT (53)	FLM H (249)	YINPY NDGTTYSEK FKG (272)	LD YGNAMD Y (297)
6	8 5H12E 8	KSSQ SLLNSGNQ RNYLS (223)	ASTR ES (227)	V Q NAYFY PFT (56)	YGV S (248)	VIWA GGNTNYNS ALMS (275)	HG YGKGNA MDN (300)

7	1 03H2B 4	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	ASTR ES (227)	V NNYFY PLT (57)	Q FLTH (252)	EINPT NGRTYYNE KFKR (276)	IY YGNSMD Y (301)
8	1 03F6D3	RSSQ SLLNGGNQ KNYLT (222)	ASTR ES (227)	V NAYFY PFT (56)	Q YSIH (238)	YINPN TIYTNYNQK FKY (277)	EG YGRGNA MDY (285)
9	1 13E12F 7	KSSQ SLFNNSGNQ KNYLT (224)	ASTR ES (227)	V Q NNYIYP LA (58)	YGV H (244)	VIWA GGSTNYDS ALMS (265)	SL YGNSFD H (302)
0	1 20B7B2	KSSQ SLLNSGNQ KNYLT (210)	ASTR ES (227)	V Q NGYYF PFT (3)	YIIQ (253)	FINPY NDGTTYNE QFKG (278)	AY FGNSFA Y (303)
1	1 11B12 D11	RSSQ SLFNNSGNQ RNYLT (225)	ASTR ES (227)	V Q NNYIYP LA (58)	YGV H (244)	VIWA GGSTNYDS TLMS (279)	SL YGNSFD H (302)
2	1 11E7E2	KSSQ SLFNNSGNQ KNYLT (224)	ASTR ES (227)	V Q NNYIYP LA (58)	YGA H (254)	VIWA GGSTNYDS ALMS (265)	SL YGNSFD H (302)
3	1 00F4G 12	KSTQ SLLNSGNQ RNYLT (226)	ASTR ES (227)	V Q NAYYY PLT (53)	FLM H (249)	YINPY NDGTTYSE RFKG (280)	LD YGNAMD Y (297)

Tabla B. CDR de 120B7B2 (numeración Kabat)

CDR	Secuencia (SEQ ID NO:)	Versiones sin riesgo (SEQ ID NO:)
1	CDRL KSSQSLLNSGNQKN YLT (210)	KSSQSLLN <u>A</u> GNQKN YLT (304) KSSQSLL <u>E</u> SGNQKNY LT (305)
2	CDRL WASTRES (227)	
3	CDRL QNGYYFPFT (3)	QN <u>A</u> YYFPFT (19) Q <u>E</u> GYYFPFT (20)
1	CDRH GYIIQ (253)	
2	CDRH FINPYNDGTKYNEQF KG (278)	FINPYND <u>D</u> TKYNEQF KG (306)
3	CDRH AYFGNSFAY (303)	AYFGN <u>A</u> FAY (307)

Tabla C. CDR de 72C1B6A3 (numeración Kabat)

CDR	Secuencia (SEQ ID NO:)	Versiones sin riesgo (SEQ ID NO:)
1	CDRL KSSQSLLNSGNQKNY LT (210)	KSSQSLLN <u>A</u> GNQKN YLT (304) KSSQSLL <u>E</u> SGNQKNY LT (305)
2	CDRL RASSRES (229)	

3	CDRL	QNDYIYPYT (8)	
1	CDRH	TYPE (242)	
2	CDRH	NFHPYNDDTKYNEKF KG (263)	
3	CDRH	RAYGYPYAMDY (289)	

Tabla D. CDR de 4F11E2 (numeración Kabat)

	CDR	Secuencia (SEQ ID NO:)	Versiones sin riesgo (SEQ ID NO:)
1	CDRL	RSSQSLLNSG NRKNY LT (216)	RSSQSLL <u>E</u> SGNRKNY LT (308) RSSQSLLN <u>A</u> GNRKNY LT (309)
2	CDRL	WASTRES (227)	
3	CDRL	QNAYSYPFT (13)	
1	CDRH	TFGMH (246)	
2	CDRH	YITSGNSPIYFTDTVK G (268)	YITSG <u>Q</u> SPIYFTDTVK G (310) YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVK G (311)
3	CDRH	SSYYGNSMDY (294)	SSYYG <u>Q</u> SMDY (312) SSYYG <u>E</u> SMDY (313) SSYYGN <u>A</u> MDY (314)

[0097] Los anticuerpos que contenían estas regiones CDR, ya fueran de ratón, humanizados o quiméricos, tenían potentes actividades inhibitoras y de unión a claudina 18.2. Como se muestra en los Ejemplos 11 y 12, ciertos residuos dentro de la CDR pueden modificarse para conservar o mejorar la propiedad, o reducir su potencial para tener modificaciones postraduccionales (PTM). Dichas CDR modificadas pueden denominarse CDR maduras por afinidad o sin riesgo.

[0098] En las **Tablas B a D**, en la tercera columna, se proporcionan ejemplos no limitativos de CDR sin riesgos. Los madurados por afinidad pueden incluir aquellos que tienen una, dos o tres adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras.

[0099] Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales parecidas, incluidas cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácidos no esencial en un polipéptido de inmunoglobulina se reemplaza preferentemente con otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales. En otra realización, una cadena de aminoácidos se puede reemplazar con una cadena estructuralmente similar que difiera en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadenas laterales.

[illegible]

	5	1		1		1													
	4		1																
	5		1																
	5		1																
	2																		
na	2																		
	3	1																	
	3																		
	2																		

Tabla F. Sustituciones de aminoácidos conservadores

Para el aminoácido	Sustitución con
Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln

Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0101] En una realización, por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 se seleccionan de las combinaciones 1 a 33 de la **Tabla A** o cada una de las combinaciones 1 a 33 en las que una o más de una CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 incluyen cada uno la adición, deleción,

sustitución conservadora de uno, dos o tres aminoácidos o combinaciones de estos.

[0102] En algunas realizaciones, se proporciona un fragmento o anticuerpo anti-CLDN18.2 que incluye CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 y CDRH3, cada uno de los cuales se selecciona de la Tabla A o las Tablas B a D. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2, y CDRL3 y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde: la CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 208 a 226, o comprende una secuencia de aminoácidos derivado de cualquiera de las SEQ ID NO: 208 a 226 mediante la adición, delección o sustitución de uno, dos o tres aminoácidos; la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 227 a 233, o comprende una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 227 a 233 mediante una adición, delección o sustitución de aminoácidos; la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19 y 42 a 58, o comprende una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19 y 42 a 58 mediante la adición, delección o sustitución de uno, dos o tres aminoácidos; la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 234 a 254, o comprende una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 234 a 254 por adición, delección o sustitución de uno, dos o tres aminoácidos; la CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 255 a 280, o comprende una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 255 a

280 por adición, delección o sustitución de uno, dos o tres aminoácidos; y la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 281 a 303, o comprende una secuencia de aminoácidos derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 281 a 303 mediante la adición, delección o sustitución de uno, dos o tres aminoácidos.

[0103] En algunas realizaciones, CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 208 a 226, 304 a 305 y 308 a 309; la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 227 a 233; la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 3, 8, 13, 19, 20 y 42 a 58; la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 234 a 254; la CDRH2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 255 a 280, 306, 310 y 311; y la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las SEQ ID NO: 281 a 303, 307 y 312 a 314.

[0104] Se ha demostrado que el anticuerpo 120B7B2 es un potente inhibidor de la claudina 18.2. Sus secuencias de CDR, junto con algunas versiones sin riesgo, se proporcionan en la Tabla B. En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde: la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de QSLNSGNQKNY (SEQ ID NO: 1), QSLNAGNQKNY (SEQ ID NO: 17) o QSLLESGNQKNY (SEQ ID NO: 18), o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 17 o 18; la CDRL2 comprende la secuencia

de aminoácidos de WAS (SEQ ID NO: 2) o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o dos aminoácidos de las SEQ ID NO: 2; la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de CQNGYYFPFT (SEQ ID NO: 3), QNAYYFPFT (SEQ ID NO: 19) o QEGYYFPFT (SEQ ID NO: 20) o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 19 o 20; la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTGYI (SEQ ID NO: 4) o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 4; la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de INPYNDGT (SEQ ID NO: 5) o INPYNDDT (SEQ ID NO: 21) o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 5 o 21; y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de ARAYFGNSFAY (SEQ ID NO: 6) o ARAYFGNAFAY (SEQ ID NO: 22) o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 6 o 22.

[0105] Es interesante notar (véase la Tabla A) que las CDR de diferentes anticuerpos comparten una gran homología. Por lo tanto, se contempla que cada CDR correspondiente pueda intercambiarse sin afectar en gran medida la actividad o afinidad de unión del anticuerpo o fragmento. Alternativamente, cada aminoácido particular en una CDR puede sustituirse con otro aminoácido presente en una CDR correspondiente de un anticuerpo diferente.

[0106] En algunas realizaciones, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde: CDRL1 comprende la secuencia de

aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 304 o 305 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 304 o 305; la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o dos aminoácidos de la SEQ ID NO: 227; la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 19 o 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 19 o 20; la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 253 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 253; la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 278 o 306 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 278 o 306; y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 303 o 307 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 303 o 307.

[0107] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 304 o 305, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 227, la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3, 19 o 20, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 253, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 278 o 306, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 303 o 307.

[0108] Los ejemplos no limitantes de una región variable de cadena ligera incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 141, 192 a 195 y 206 a 207, o un equivalente biológico, tal como un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 141, 192 a 195 y 206 a 207.

[0109] Los ejemplos no limitantes de una región variable de cadena pesada incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 171, 188 a 191 y 205, o un equivalente biológico, tal como un péptido que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 171, 188-191 y 205.

[0110] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 304, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 227, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 253, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 306, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 307. Un ejemplo no limitativo del anticuerpo o fragmento incluye una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 206 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 205.

[0111] Asimismo, se ha demostrado que 72C1B6A3 es un buen anticuerpo. En otra realización, por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde: la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 304 o 305 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 210, 304 o 305; la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 229 o una secuencia

de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o dos aminoácidos de la SEQ ID NO: 229; la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 8; la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 242 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 242; la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 263 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 263; y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 289 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 289.

[0112] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 210, 304 o 305, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 229, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 242, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 263, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 289.

[0113] Los ejemplos no limitantes de una región variable de cadena ligera incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 124, 185 a 187 y 203 a 204, o un equivalente biológico, tal como un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 124, 185 a 187 y 203 a 204.

[0114] Los ejemplos no limitativos de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 153 y 181 a 184, o un equivalente biológico, tal como un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de

secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 153 y 181 a 184.

[0115] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 304, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 229, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 242, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 263, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 289. Un ejemplo no limitante de anticuerpo o fragmento de este incluye una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 203 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 181.

[0116] Además, se ha demostrado que 4F11E2 es un buen anticuerpo. En otra realización, por lo tanto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de este que tiene especificidad de unión a una proteína claudina 18.2 (CLDN18.2) humana de tipo natural, donde el anticuerpo o fragmento de este comprende una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada CDRH1, CDRH2 y CDRH3; y donde: la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 216, 308 o 309 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 216, 308 o 309; la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 227 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o dos aminoácidos de la SEQ ID NO: 227; la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 13; la CDRH1 comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 246 o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de la SEQ ID NO: 246; la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 268, 310 o 311, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 268, 310 o 311; y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 294, 312, 313 o 314, o una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno, dos o tres aminoácidos de las SEQ ID NO: 294, 312, 313 o 314.

[0117] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 216, 308 o 309, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 227, la CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 246, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 268, 310 o 311, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 294, 312, 313 o 314.

[0118] Los ejemplos no limitantes de una región variable de cadena ligera incluyen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 129, 178 a 180 y 201 a 202, o un equivalente biológico, tal como un péptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 129, 178 a 180 y 201 a 202.

[0119] Los ejemplos no limitantes de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 159, 175 a 177 y 196 a 200, o equivalentes biológicos, tales como un péptido que tiene al menos un 90% de secuencia identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 159, 175-177 y 196-200.

[0120] En algunas realizaciones, la CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 309, la CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 227, CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, la CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 246, la CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 311, y la CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 294. Un ejemplo no limitativo del anticuerpo o fragmento incluye una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 202 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 197.

[0121] En algunas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados, como se muestra en el Ejemplo 9, pueden incluir una o más mutaciones posteriores al homólogo de ratón. En la Tabla 3, se muestran ejemplos de tales mutaciones inversas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento puede incluir una, dos, tres, cuatro, cinco o más de las mutaciones inversas.

[0122] En algunas realizaciones, el anticuerpo anticlaudina 18.2 de la presente divulgación incluye una VL de una cualquiera de las SEQ ID NO: 117 a 144, 178 a 180, 185 a 187, 192 a 195, 201 a 202, 203 a 204 o 206 a 207, y un VH de una cualquiera de las SEQ ID NO: 145 a 174, 175 a 177, 181 a 184, 188 a 191, 196 a 200 o 205, o sus respectivos equivalentes biológicos. Un equivalente biológico de un VH o VL es una secuencia que incluye los aminoácidos designados a la vez que tiene una identidad de secuencia global del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%. Por lo tanto, un equivalente biológico de la SEQ ID NO: 145 puede ser un VH que tiene una identidad de secuencia general del 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 145, pero retiene las CDR y, opcionalmente, retiene una o más mutaciones inversas, o todas ellas.

[0123] Un experto en la técnica también comprenderá que los anticuerpos según se divulga en el presente documento pueden modificarse de manera tal que varían en secuencia de aminoácidos a partir del polipéptido de unión que ocurre de manera natural a partir del cual se derivan. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de aminoácidos derivados de una proteína designada puede ser similar, p. ej., tienen una determinada identidad del porcentaje a la secuencia inicial, p. ej., puede ser 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% idéntica a la secuencia inicial.

[0124] En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o una o más porciones no asociadas normalmente con un anticuerpo. Las modificaciones de ejemplo se describen en mayor detalle a continuación. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una secuencia conectora flexible, o puede modificarse para añadir una porción funcional (p. ej., PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta).

[0125] Los anticuerpos, variantes, o derivados de estos de la divulgación incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de forma tal que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una al epítipo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos pueden modificarse, p. ej., mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las varias modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas, incluidos, pero sin limitación, escisión química, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Conjugados anticuerpo-fármaco

[0126] En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos pueden conjugarse en agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas,

enzimas, virus, lípidos, modificadores de respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

[0127] En una realización, los anticuerpos o fragmentos de la divulgación están unidos de manera covalente a una porción del fármaco. La porción del fármaco puede ser, o modificarse para incluir, un reactivo del grupo con un punto de conjugación en el anticuerpo. Por ejemplo, una porción del fármaco puede adjuntarse mediante alquilación (p. ej., en las lisinas del grupo épsilon-amino o el N-terminal de anticuerpos), aminación reductora de carbohidrato oxidado, transesterificación entre los grupos hidroxilo y carboxilo, amidación en los grupos amino o grupos carboxilo, y conjugación a tioles.

[0128] En algunas realizaciones, la cantidad de porciones de fármaco, p , conjugadas por intervalos de molécula de anticuerpo a partir de un promedio de 1 a 8; 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2. En algunas realizaciones, p varía de un promedio de 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4 o 2 a 3. En otras realizaciones, p es un promedio de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8. En algunas realizaciones, p varía de un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 1 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 10, aproximadamente 2 a aproximadamente 9, aproximadamente 1 a aproximadamente 8, aproximadamente 1 a aproximadamente 7, aproximadamente 1 a aproximadamente 6, aproximadamente 1 a aproximadamente 5, aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o aproximadamente 1 a aproximadamente 2. En algunas realizaciones, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 8, aproximadamente 2 a aproximadamente 7, aproximadamente 2 a aproximadamente 6, aproximadamente 2 a aproximadamente 5, aproximadamente 2 a aproximadamente 4 o aproximadamente 2 a aproximadamente 3.

[0129] Por ejemplo, cuando la activación química de los resultados proteínicos en la formación de grupos tiol libres, la proteína puede conjugarse con un agente reactivo de sulfhidrilo. En un aspecto, el agente es uno en el que es sustancialmente específico para los grupos tiol libre. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, maleimida, haloacetamidas (p. ej., yodo, bromo o cloro), haloésteres (p. ej., yodo, bromo o cloro), cetonas de halometilo (p. ej., yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (p. ej., yoduro, bromuro o cloruro), vinilsulfona y piridiltio.

[0130] El fármaco puede unirse al anticuerpo o fragmento mediante un conector. Los conectores adecuados incluyen, por ejemplo, conectores escindibles o no escindibles. Un conector escindible en general es susceptible a la escisión en condiciones intracelulares. Los conectores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un conector de péptido escindible mediante una endopeptidasa intracelular, tal como endopeptidasa lisosomal o una endopeptidasa endosomal. En realizaciones de ejemplo, el conector puede ser un conector dipeptídico, tal como un valina-citrulina (val-cit), un conector fenilalanina-lisina (phe-lys), o un conector maleimidocaprónico-valina-citrulina-p-aminobenziloxicarbonilo (mc-Val-Cit-PABA). Otro conector es sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (smcc). La conjugación sulfo-smcc ocurre a través de un grupo maleimida que reacciona con sulfhidrilos (tioles, —SH), mientras que su éster sulfo-NHS es reactivo hacia las aminas primarias (como se encuentra en lisina y el N-terminal de la proteína o el péptido). Incluso otro conector es maleimidocaproilo (mc). Otros conectores adecuados incluyen conectores hidrolizables en un pH específico o un intervalo de pH, tal como un conector de hidrazona. Otros conectores escindibles adecuados incluyen conectores de disulfuro. El conector puede unirse de manera covalente al anticuerpo a tal medida que el anticuerpo debe degradarse de manera intracelular para que el fármaco se libere, p. ej., el conector mc y similares.

[0131] Un conector puede incluir un grupo para la conexión al anticuerpo. Por ejemplo, el conector puede incluir un grupo reactivo de amino,

hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo (p. ej., maleimida, haloacetamidas (p. ej., yodo, bromo o cloro), haloésteres (p. ej., yodo, bromo o cloro), cetonas de halometilo (p. ej., yodo, bromo o cloro), haluros bencílicos (p. ej., yoduro, bromuro o cloruro), vinilsulfona y piridiltio).

[0132] En algunas realizaciones, la porción del fármaco es un agente citotóxico o citoestático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, una toxina, o similares. El conjugado puede usarse para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, que provoca la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, y/o para tratar el cáncer en un paciente. El conjugado se puede utilizar en consecuencia en uno o más de una serie de contextos para el tratamiento de cánceres en animales. El conjugado puede usarse para suministrar un fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin desear limitarse a la teoría, en algunas realizaciones, el conjugado se une a o se asocia con una célula cancerosa que expresa claudina 18.2, y el conjugado y/o el fármaco puede ser absorbido dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de la endocitosis mediada por el receptor.

[0133] Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas del péptido dentro del conjugado (p. ej., en un conector) se escinden de forma hidrolítica mediante una o más endopeptidasas asociadas a la célula tumoral o a la célula cancerosa, lo que provoca la liberación del fármaco. El fármaco liberado luego puede migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citoestáticas u otras actividades. En algunas realizaciones, el fármaco se escinde del anticuerpo fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y posteriormente, el fármaco penetra la célula, o actúa en la superficie celular.

[0134] Los ejemplos de porciones o cargas efectivas de fármaco se seleccionan del grupo que consiste en DM1 (maitansina, N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)- o N2'-deacetil-N2'-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina), mc-MMAD (6-maleimidocaproil-monometilauristatin-D o N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-2-metoxi-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-metoxi-2-metil-3-oxo-3-[(1S)-2-fenil-1-

(2-tiazolil)etil]amino]propil]-1-pirrolidinil]-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-(9Cl)-L-valinamida), mc-MMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F o N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-N-metil-L-valil-L-valil-(3R,4S,5S)-3-metoxi-5-metil-4-(metilamino)heptanoil-(α R, β R,2S)- β -metoxi- α -metil-2-pirrolidinepropanoil-L-fenilalanina) y mc-Val-Cit-PABA-MMAE (6-maleimidocaproil-ValcCit-(p-aminobenziloxycarbonil)-monometilauristatina E o N-[[[4-[N-[6-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pirrol-1-il)-1-oxohexil]-L-valil-N5-(aminocarbonil)-L-ornitil]amino]fenil]metoxi]carbonil]-N-metil-L-valil-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-hidroxi-1-metil-2-feniletil]amino]-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil]-1-pirrolidinil]-2-metoxi-1-[(1S)-1-metilpropil]-4-oxobutil]-N-metil-L-valinamida). DM1 es un derivado del inhibidor de tubulina maitansina mientras que MMAD, MMAE y MMAF son derivados de auristatina. En algunas realizaciones, la porción del fármaco se selecciona del grupo que consiste en mc-MMAF y mc-Val-Cit-PABA-MMAE. En algunas realizaciones, la porción del fármaco es un maitansinoide o una auristatina.

[0135] Los anticuerpos o fragmentos pueden conjugarse con o fusionarse a un agente terapéutico, que puede incluir etiquetas detectables tales como etiquetas radioactivas, un inmunomodulador, una hormona, una enzima, un oligonucleótido, un agente terapéutico o diagnóstico fotoactivo, un agente citotóxico, que puede ser un fármaco o una toxina, un agente potenciador de ultrasonido, una etiqueta no radioactiva, una combinación de estos y otros agentes similares conocidos en la técnica.

[0136] Los anticuerpos pueden etiquetarse de manera detectable mediante el acoplamiento a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del polipéptido de unión al antígeno etiquetado con quimioluminiscencia luego se determina al detectar la presencia de luminiscencia que emerge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de los compuestos de etiquetado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

[0137] Los anticuerpos también pueden etiquetarse de manera detectable usando metales que emiten fluorescencia tal como ^{152}Eu , u otros de la serie de lantanida. Estos metales pueden adjuntarse al anticuerpo usando dichos grupos quelantes metálicos como ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA) o ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA). Las técnicas para porciones de conjugación terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al.* "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.*, (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos y métodos para preparar los anticuerpos

[0138] La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados o moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, variantes o derivados de estos de la divulgación. Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar la totalidad de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótido separadas. Además, los polinucleótidos de la presente divulgación pueden codificar porciones de las regiones variables de cadena pesada y ligera de los polipéptidos de unión al antígeno, variantes o

derivados de estos en la misma molécula de polinucleótido o en moléculas de polinucleótido separadas.

[0139] Los métodos para elaborar anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. En determinadas realizaciones, ambas regiones, la variable y la constante de los polipéptidos de unión al antígeno de la presente divulgación son completamente humanas. Los anticuerpos completamente humanos pueden hacerse usando técnicas descritas en la técnica y tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico pueden prepararse al administrar el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a un desafío antigénico, pero cuyos locus endógenos se han deshabilitado. Las técnicas de ejemplo que se pueden utilizar para elaborar dichos anticuerpos se describen en las patentes de EE. UU.: 6,150,584; 6,458,592; 6,420,140 que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Métodos de tratamiento

[0140] Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos, variantes, derivados o conjugados anticuerpo/fármaco de la presente divulgación pueden usarse en determinados tratamientos y métodos de diagnóstico.

[0141] La presente divulgación se dirige, además, a terapias con base en anticuerpos que implica la administración de los anticuerpos, fragmentos, o conjugados anticuerpo/fármaco de la divulgación a un paciente tal como un animal, un mamífero y un humano para tratar uno o más de los trastornos o afecciones descritos en el presente documento. Los compuestos terapéuticos de la divulgación incluyen, a mero título enunciativo, los anticuerpos de la divulgación (incluidos variantes y derivados de estos tal como se describe en el presente documento) y ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican

anticuerpos de la divulgación (incluidos variantes y derivados de estos tal como se describe en el presente documento).

[0142] Los anticuerpos de la divulgación también pueden usarse para tratar o inhibir el cáncer. Como se proporciona anteriormente, la claudina 18.2 puede sobreexpresarse en células tumorales, en particular los tumores gástrico, pancreático, esofágico, ovárico y pulmonar. La inhibición de la claudina 18.2 ha demostrado ser útil para tratar los tumores.

[0143] Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita. El método, en una realización, implica administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento, o conjugado anticuerpo-fármaco de la presente divulgación. En algunas realizaciones, al menos una de las células cancerosas (p. ej., células estromales) en el paciente sobreexpresa claudina 18.2.

[0144] Las terapias celulares, tales como las terapias de la célula T del receptor de antígeno quimérico (CAR), también se proporcionan en la presente divulgación. Se puede usar una célula adecuada, que se pone en contacto con un anticuerpo anti-claudina 18.2 de la presente divulgación (o de manera alternativa se diseña para expresar un anticuerpo anti-claudina 18.2 de la presente divulgación). En dicho contacto o diseño, la célula luego se puede introducir en un paciente con cáncer que necesita un tratamiento. El paciente de cáncer puede tener un cáncer de cualquier tipo según se divulga en el presente documento. La célula (p. ej., célula T) puede ser, por ejemplo, un linfocito T que se infiltra en el tumor, una célula T CD4+, una célula T CD8+, o la combinación de estos, sin limitación.

[0145] En algunas realizaciones, la célula se aisló del paciente de cáncer por sí sola. En algunas realizaciones, la célula se proporcionó a partir de un donante o de un banco de células. Cuando la célula se aísla del paciente de cáncer, pueden minimizarse las reacciones inmunitarias no deseadas.

[0146] Los ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, melanoma, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el cáncer es uno o más de cánceres gástrico, pancreático, esofágico, ovárico y pulmonar.

[0147] Otras enfermedades o afecciones asociadas con un aumento de la supervivencia celular que se puede tratar, prevenir, diagnosticar y/o pronosticar con los anticuerpos o variantes, o derivados de estos de la divulgación incluyen, a mero título enunciativo, la evolución y/o metástasis de las neoplasias y los trastornos relacionados tal como leucemia (incluidas leucemias agudas [p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda {incluidas leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia}] y leucemias crónicas [p. ej., leucemia mielocítica crónica {granulocítica} y leucemia linfocítica crónica]), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada y tumores sólidos, incluidos, a mero título enunciativo, sarcomas y carcinomas tal como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de células basal, adenocarcinoma, carcinoma de la glándula de sudoración, carcinoma de la glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de esa célula renal, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embriónico, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de

pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

[0148] Una dosis específica y un esquema posológico de tratamiento para cualquier paciente particular dependerá de una o más de una serie de factores, incluidos los anticuerpos particulares, variante o derivado de este empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente, y el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, y la gravedad de la enfermedad particular que se está tratando. El criterio de dichos factores por parte de los criadores médicos se encuentra dentro de la capacidad en la técnica. La cantidad también dependerá del paciente individual que será tratado, la vía de administración, el tipo de formulación, las características del compuesto utilizado, la gravedad de la enfermedad y el efecto deseado. La cantidad utilizada puede determinarse mediante principios farmacológicos y farmacocinéticos bien conocidos en la técnica.

[0149] Los métodos de administración de los anticuerpos, fragmentos, o conjugados anticuerpo/fármaco o que incluye, a mero título enunciativo, vías de administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los polipéptidos o las composiciones de unión al antígeno pueden administrarse mediante una vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de unión al antígeno de la divulgación pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como en polvos, ungüentos, gotas o parche transdérmico), bucal, o como una pulverización oral o nasal.

[0150] El término “parenteral” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a modos de administración que incluye en intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrasternal, subcutánea e inyección e infusión intraarticular.

[0151] La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los anticuerpos de la divulgación en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluida inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, adjunto una reserva, tal como una reserva Ommaya. También puede emplearse la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

[0152] Puede ser deseable administrar los polipéptidos o las composiciones de unión al antígeno de la divulgación localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, la infusión local durante la cirugía, la aplicación tópica, p. ej., junto con un revestimiento de herida después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, dicho implante es de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, incluido un anticuerpo, de la divulgación, que se tenga cuidado en usar materiales en los que no absorbe la proteína.

[0153] La cantidad de los anticuerpos, fragmentos, o conjugados anticuerpo/fármaco de la divulgación que serán eficaces en el tratamiento, la inhibición y la prevención de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria, inmunitaria o maligna pueda determinarse mediante técnicas clínicas estándares. Además, los ensayos *in vitro* se pueden emplear, opcionalmente, para ayudar a identificar los márgenes de dosificación óptimos. La dosis exacta que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de

administración, y la gravedad de la enfermedad, del trastorno o la afección y se debe decidir según el criterio del médico y cada circunstancia del paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta de dosis derivadas de los sistemas de prueba *in vitro* o de modelo de animal.

[0154] Como proposición general, la dosis administrada a un paciente de los anticuerpos, fragmentos, o conjugados anticuerpo/fármaco de la presente divulgación en general es de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente, entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, o 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo son posibles las dosis más bajas de los anticuerpos humanos y una administración con menos frecuencia. Además, la dosis y frecuencia de administración de anticuerpos de la divulgación puede reducirse al potenciar la absorción y penetración del tejido (p. ej., en el cerebro) de los anticuerpos mediante modificaciones tal como, por ejemplo, lipidación.

[0155] En otra realización, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con citocinas. Las citocinas que se pueden administrar con las composiciones de la divulgación incluyen, a mero título enunciativo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, anti-CD40, CD40L y TNF- α .

[0156] En otras realizaciones, las composiciones de la divulgación se administran en combinación con otros esquemas terapéuticos o profilácticos, tal como, por ejemplo, radioterapia.

Composiciones

[0157] La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo, fragmento, o conjugado anticuerpo-fármaco y un

excipiente aceptable. En algunas realizaciones, la composición incluye, además, un segundo agente contra el cáncer (p. ej., un inhibidor de puntos de control inmunitario).

[0158] En una realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por el organismo regulador del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales y, más particularmente, en seres humanos. Además, un excipiente farmacéuticamente aceptable en general será un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

[0159] El término “excipiente” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el tratamiento. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos que se originan del petróleo o son de origen animal, vegetal o sintético, tales como el aceite de maní, el aceite de soja, el aceite mineral, el aceite de sésamo y similares. El agua es un excipiente preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticamente adecuados incluyen almidón, glucosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glico, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades pequeñas de humectantes o emulsionantes o tampones de pH tales como acetatos, citratos o fosfatos. También se prevén los agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilenodiaminatetraacético; y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. Estas composiciones pueden

tener forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulación de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir excipientes estándares, tales como las calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de excipientes farmacéuticos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin, en el presente documento por de referencia. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de unión al antígeno, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de excipiente para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse al modo de administración. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

[0160] En una realización, la composición se formula de conformidad con los procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. En general, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y una anestesia local tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los ingredientes se suministran de forma separada o se mezclan juntos en la forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o sachet que indica la cantidad del agente activo. Donde la composición se administrará mediante infusión, puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico o solución salina. Donde la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una

ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de forma tal que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

[0161] Los compuestos de la divulgación se pueden formular como formas neutrales o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con cationes, tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales murinos contra la isoforma 2 de claudina 18 humana (CLD 18A2)

a. Inmunizaciones:

[0162] Se inmunizaron los ratones Balb/c y C57/BL6 con vectores de expresión eucariota, que codifican fragmentos de claudina 18.2 humana (CLD 18A2). Se inyectaron 50 µg de DNA de plásmido en los cuádriceps (intramuscular, i.m.) el día 1 y 10. La presencia de anticuerpos dirigidos contra CLD 18A2 humana en el suero de los ratones se monitoreó el día 20 mediante citometría de flujo, usando células HEK293 transfectadas de manera transitoria con un ácido nucleico que codifica CLD 18A2 humana. Los ratones con respuestas inmunitarias detectables (**Figura 1**) recibieron una vacuna de refuerzo tres y dos días antes de la infusión mediante inyección intraperitoneal de 5×10^7 de células HEK293 transfectadas de manera transitoria con un ácido nucleico que codifica CLD 18A2 humana.

b. Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra CLD18A2:

[0163] Se aislaron los esplenocitos de ratón y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón según los protocolos estándares. Los hibridomas luego se seleccionaron para la producción de inmunoglobulinas

con especificidad de CLD 18A2 usando células HEK293 transfectadas con un ácido nucleico que codifican CLD18 humana mediante ELISA de célula.

[0164] Las suspensiones de célula comunicado de los linfocitos esplénicos de los ratones inmunizados se fusionaron con las células de mieloma de ratones que no secretan P3X63Ag8U.1 (ATCC, CRL 1597) en una relación 2:1 usando 50% de PEG (Roche Diagnostics, CRL 738641). Las células se colocaron en placas en aproximadamente 3×10^4 /pocillo en placas de micro títulos de fondo plano, seguido de aproximadamente dos semanas de incubación en un medio selectivo que contiene 10% de suero bovino fetal, 2% de fusión de hibridoma y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) más 10 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 µg/mL de gentamicina y 1x de HAT (Sigma, CRL H0262). Después de 10 a 14 días se seleccionaron los pocillos individuales mediante el ELISA de células para los anticuerpos monoclonales anti-CLD 18A2 (**Figura 2**). Luego, los hibridomas que secretan anticuerpo se volvieron a colocar en placas, se volvieron a detectar con HEK293 que expresan CLD 18A2 o CLD 18A1 mediante FACS y, si aún son positivos para CLD18A2 y negativos para CLD18A1, se subclonaron mediante dilución limitante. Los subclones estables luego se cultivaron *in vitro* para generar cantidades pequeñas de anticuerpo en el medio de cultivo del tejido para la caracterización. Se eligió al menos un clon de cada hibridoma, que conservo la reactividad de las células originales (mediante FACS). Se generaron tres bancos de células de vial para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

c. Selección de anticuerpos monoclonales que se unen a CLD 18A2 no a CLD18A1:

[0165] Para determinar el isotipo de anticuerpos, se llevó a cabo un ELISA de isotipo. Se utilizó el equipo monoAB ID de ratón (Zymed, CRL 90-6550) para determinar las subclases de Ig de los anticuerpos monoclonales de reactivos de CLD18A2 identificados. Se generaron 32 líneas celulares de hibridoma: 64G11B4, 65G8B8, 56E8F10F4, 54A2C4, 44F6B11, 15C2B7,

20F1E10, 72C1B6A3, 58G2C2, 101C4F12, 103A10B2, 40C10E3, 78E8G9G6, 4F11E2, 10G7G11, 12F1F4, 78C10B6G4, 119G11D9, 113G12E5E6, 116A8B7, 105F7G12, 84E9E12, 103F4D4, 110C12B6, 85H12E8, 103H2B4, 103F6D3, 113E12F7, 120B7B2, 111B12D11, 111E7E2, y 100F4G12, con otros detalles como se muestra a continuación:

64G11B4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 65G8B8, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 56E8F10F4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 54A2C4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 44F6B11, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 15C2B7, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 20F1E10, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 72C1B6A3, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 58G2C2, IgG2a monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 101C4F12, IgG2b monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 103A10B2, IgG2b monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 40C10E3, IgG1 monoclonal de ratón, λ anticuerpo
 78E8G9G6, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 4F11E2, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 10G7G11, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 12F1F4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 78C10B6G4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 119G11D9, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 113G12E5E6, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 116A8B7, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 105F7G12, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 84E9E12, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 103F4D4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 110C12B6, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo

85H12E8, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 103H2B4, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 103F6D3, IgG1 monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 113E12F7, IgG2a monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 120B7B2, IgG2a monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 111B12D11, IgG2a monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 111E7E2, IgG2a monoclonal de ratón, κ anticuerpo
 100F4G12, IgG3 monoclonal de ratón, κ anticuerpo.

Ejemplo 2. Secuenciación de hibridoma

[0166] Las células de hibridoma (1×10^7) se recopilaron y se extrajo el RNA total usando el reactivo Tri conforme se describe arriba para el tejido del bazo. Se preparó cDNA usando el equipo SuperScript III según la instrucción del fabricante descrita anteriormente. El producto de cDNA resultante se utilizó como plantilla para PCR con cebadores VhRevU y VhForU, se limpió el producto PCR de 300 bp usando un equipo de limpieza de PCR y se secuenció con el mismo cebador. También se llevó a cabo la reacción de PCR con cebadores VkRev7 y VkFor (únicamente para la región variable) o cebadores KappaFor (para toda la cadena ligera kappa) específico de la región V de cadena ligera. Se llevaron a cabo las reacciones de secuenciación en el producto PCR para obtener las secuencias de DNA para los anticuerpos, 64G11B4, 65G8B8, 56E8F10F4, 54A2C4, 44F6B11, 15C2B7, 20F1E10, 72C1B6A3, 58G2C2, 101C4F12, 103A10B2, 40C10E3, 78E8G9G6, 4F11E2, 10G7G11, 12F1F4, 78C10B6G4, 119G11D9, 113G12E5E6, 116A8B7, 105F7G12, 84E9E12, 103F4D4, 110C12B6, 85H12E8, 103H2B4, 103F6D3, 113E12F7, 120B7B2, 111B12D11, 111E7E2 y 100F4G12. Sus secuencias variables (VH y VL) se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Secuencias de las regiones variables de los anticuerpos

Cade na del anticuerpo	Secuencia	S EQ ID NO:
Cade nas ligeras		
64G1 1B4	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCKSSQSLLN SGNQQRNYLTWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQADDLAVYYCQNDYFY PFTFGAGTNLELK	1 17
65G8 B8	DIMMTQSPSSLTVTTGEKVTLTCKSSQSLLN SGNLKNYLTWYQQKPGHPP KLLIWASTRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLTVYYCQNVYIY PFTFGSGTKLEMR	1 18
56E8 F10F4	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTIS SVQAADLAVYYCQNDYYF PFTFGSGTKLEIK	1 19
54A2 C4	DTVMTQFPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLL NGGNQKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNDLYY PWTFGGGTKLEFK	1 20
44F6 B11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVIMSCSNQSLLN SGNQKKYLTWYQQKPGQSP	1 21

	KLLIYWASTRESGVPDRFTGSESGTDFTLTIS SVRAEDLAVYYCQNGYSY PFTFGSGTKLEMK	
15C2 B7	DIVMTQSPSSLTVTAGGKVTVSCCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQTEDLAVYYCQNNYYF PLTFGAGTKLELK	1 22
20F1 E10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQRNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFILTIT KVQAEDLAVYYCQNVYSY PLTFGAGTKLELK	1 23
72C1 B6A3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQRPGQPP KLLIYRASSRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNDYIY PYTFGGGKLEMN	1 24
58G2 C2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP TLLIFWAFTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIN SVQAEDLAVYYCQNSYSY PFTFGSGTKLEIK	1 25
101C 4F12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQRNYLTWYQQKPGQPP RLLIYWSSTRDSGVPDRFTGSGSRTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNNFIY	1 26

	PLTFGAGTKLELK	
103B 2	DIVMTQSPSSLTVTPGEKVTMSCRSSMSLFN SGNQKSYLSWYHQKPGQPP KLLIYWASTRDSGVPVRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCHNDYIY PLTFGAGTKLELK	1 27
78E8 G9G6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCRSIQSLN SGNQKNYLSWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI RSVLDEDLAVYYCQNSYSY PFTFGSGTKLEMK	1 28
4F11 E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTLTCRSSQSLN SGNRKNYLTWYQQIPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNAYSY PFTFGSGTKLEKK	1 29
10G7 G11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCKSSQSLFN SGNQQRNYLTWYQRKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTV SSVQAEDLAVYYCQNAYYF PFTFGSGTKLEKK	1 30
12F1 F4	DIVMTQSPSSLTVTARERVSMTCSSQSLFN SGNQQRNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWSSTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAIYFCQNNYYY PFTFGSGTKLEIK	1 31

78C1 0B6G4	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQRPGQPP KLLIYRASSRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNDYIY PYTFGGGKLEMN	1 24
119G 11D9	DIVMTQSPSSLTVTAGERTMRCRSTQSLFN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGGGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNAYYY PLTFGAGTKLERK	1 32
113G 12E5E6	DIVMTQSPSSLTVTAGERTMRCRSTQSLFN SGNQKNYLAWYQQKPGQPP KLLLYWASTRESGVPDRFKGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNAYFY PCTFGGGKLEMK	1 33
116A 8B7	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSTQSLFN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNAYYY PLTFGVGKLERK	1 34
105F 7G12	DIVMTQSPSSLTVTAGERTMRCRSTQSLFN SGNQKNYLAWYQQKPGQPP KLLLYWASTRESGVPDRFKGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNAYFY PCTFGGGKLEMK	1 35
84E9 E12	DIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMSCKSSQSVFN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP	1 36

	KLLVYWASTRESGVPARFTGSGSGTVFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNDYYF PLTFGAGTRLELK	
103F 4D4	DIVMTQSPSSQTVTAGEKVTLSQRSSQSLLN GGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTFTI SSVQAEDLAVYYCQNAYFY PFTFGAGTKLELK	1 37
110C 12B6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSTQSLFN SGNQQRNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNAYYY PLTFGVGKLERK	1 34
85H1 2E8	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCKSSQSLLN SGNQQRNYLSWYQQEPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SNIQAEDLALYFCQNAYFY PFTFGSGTKLEIK	1 38
103H 2B4	DILMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNNYFY PLTFGVGKLELK	1 39
103F 6D3	DIVMTQSPSSQTVTAGEKVTLSQRSSQSLLN GGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTFTI SSVQAEDLAVYYCQNAYFY	1 37

	PFTFGAGTKLELK	
113E 12F7	DIVMTQSPSSLTVTTGEKVTMSCKSSQSLFN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTYFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNNYIY PLAFGTGTKLELK	1 40
120B 7B2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQRPGQPP KLLMYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSGQAEDLAIYFCQNGYYF PFTFGSGTKLETK	1 41
111B 12D11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCRSSQSLFN SGNQQRNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNNYIY PLAFGAGTKLELK	1 42
111E 7E2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLFN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQNNYIY PLAFGAGTKLELK	1 43
100F 4G12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMRCKSTQSLLN SGNQQRNYLTWYQQKPGQSP KLLIYWASTRESGVPERFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLAVYYCQNAYYY PLTFGPGTKLERK	1 44

Cade na pesada		
64G1 1B4	QVQLHQSGTELVRPGTSVKVSCKASGYAFT NYLLEWVKQRPGQGLEWIGE INPGNGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSVDSAVYFCARIY YGNSFAYWGQGTLVTVSA	1 45
65G8 B8	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTS YGVSWVRQPPGKGLEWLGV IWGDGNTIYHSALKSRLSISRDN SKRQVFLK VNSLQIDDTATYYCAKQGL YGHAMDYWGQGT SVIVSS	1 46
56E8 F10F4	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCTASGFTFN SFGMNWVRQAPEKGLEWVAF ISGGSNTIHYLDTVKG RFTISRDNPKNTLFLQ MTSLRSED TAMYYCTRLA LGNAMDYWGQGT SVIVSS	1 47
54A2 C4	EVQHVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFN TNAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKSN NYATYYADSVKDRFTISRDDSQSML YVQMNNLKTEDTAMYYCVS GAYYGNSKAFDYWGQGT LVTVSA	1 48
54A2 C4'	QVQLHQSGTELVRPGTSVKVSCKASGYAFT NYLLEWVKQRPGQGLEWIGE INPGNGGSNYNEKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSVDSAVYFCARIY YGNSFAYWGQGTLVTVSA	1 45

54A2 C4"	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFP TYSIHWLKQGPQGQGLEWIGY INPSTIYTNYNQKFYKATLTADKSSSTAYIQL SSLTSDDSAVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 49
44F6 B11	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS NYGMSWVRQTPDKRLEWVAT FSYGDSHNYYSDSVKGRFTISRDIKDALYL QMSSLRSEDTAIYYCARFG RGNTMDYWGQGTSVTVSL	1 50
15C2 B7	QIQLVQSGPELRKPGETVKISCKASGYTFTN YGMNWVKQAPGKGLKWMWAW INANTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSARSAYL QINSLKNEDTATYFCARLT RGNSFDYWGQGTTTLTVSS	1 51
20F1 E10	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTK YGMNWVRQAPGKGLKWMGW ISTNTGEPTYAEEFKGRFAFSLETSASTAFLQ INNKNEDTATYFCARLV RGNSFDFWGQGITLTVSS	1 52
72C1 B6A3	QVQLQQSGGELVKPGASVKMSCKAFGYTFT TYPIEWMKQNHGKSLEWIGN FHPYNDDTKYNEKFKGKAKLTVEKSSSTVYL EVSRLTSDDSAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGTSVTVSS	1 53
58G2 C2	QVHLQQSGAEVVRPGTSVKVSCCKASGYAFT NYLIEWIKRPGQGQGLEWVG	1 54

	INPGRSGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSDDSAVYFCARTR YGGNAMDYWGQGTSTVTVSS	
101C 4F12	QVQLKESGPGQVAPSQSLSIAC TVSGFSLSS YGVHWVRQPPGKGLEWLG V IWAGGSTNYDSALMSRLTISKDNSRTRVFLK MNSLQTDDTAIYYCARSLY GNSLDSWGP GTTLTVSS	1 55
103B 2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGLSLTS FGVHWIRQPPGKGLEWLG V IWAGGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVYLK MHSLQTDDTAMYYCARSLY GNSFDYWGQGTALT VSS	1 56
40C1 0E3	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSS YGVNWVRQPPGKGLEWLAA IRSDGIITYNSVLKSRLRISKDNSKSQVFLKM NSLQTDDTAMFYCARWFR GNVLDYWGQGTSTVTVSS	1 57
78E8 G9G6	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLISY GVHWVRQPPGKGLEWLG V IWAGGR TNYSALMSRLSISKDNSKSQVFLK MNSLQTYDTAMYYCARDRY GGNSLDYWGQGTSTVTVSS	1 58
4F11 E2	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS TFGMHWVRQAPEKGLEWVAY ITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQ MTSLGSEDTAVYYCARSS	1 59

	YYGNSMDYWGQGTSVTVSS	
10G7 G11	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTISGFSLNTY GVHWVRQPPGKGLEWLWV MLSDGNTVYNSSLKSRLSLTKDNSKSQLLLK MNSLQTDDTAIYYCARHKA YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 60
12F1 F4	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLINY GVSWVRQPPGKGLEWLG IWGDGNTNYQSALRSRLSIRKDTSKSQVFLK LNSVHTDGTATYYCAKVGR GNAMDHWGQGISVIVSS	1 61
78C1 0B6G4	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLINY GVSWVRQPPGKGLEWLG IRGDGNTNYQSALRSRLSIRKDTSKSQVFLK LNSVHTDGTATYYCAKVGR GNAMDHWGQGISVIVSS	1 62
119G 11D9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT GFLMHVWKQKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAFM ELSSLTSDDSAVYYCARLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 63
113G 12E5E6	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSDFLTK YGVHWFRQSPGKGLEWLG IWTGGNTDYNPALIPRLSFRKDNSKSQVFFK MNSLQSSDTAVYYCARNGY YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 64

116A 8B7	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKSSGYTFT GFLMHWVKQKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYM ELSSLTSDDSAVYYCGRLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 65
105F 7G12	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSD FSLTK YGVHWFRQSPGKGLEWLG V IWTGGNTDYNPALIPRLSFRKDNSKSQVFFK MNSLQSSDTAVYYCARNGY YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 64
84E9 E12	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLSCSVTGYSITS GYFWTWFRQFPGNKLEWMG YISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLK LNSVTTEDTATYYCASFR FFAYWGQGTLVTVSA	1 66
103F 4D4	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFP TYSIHWLKQGPQGLEWIGY INPSTIYTNYNQKFYKATLTADKSSSTAYIQL SSLTSDDSAVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 49
110C 12B6	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKSSGYTFT GFLMHWVKQKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYM ELSSLTSDDSAVYYCGRLD YGNAMDYWGQGTSVTVSS	1 65
85H1 2E8	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSG FSLSN YGVSWVRQPPGKGLEWLG V	1 67

	IWAGGNTNYNSALMSRLRISKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTARYYCARHGY GKGNAMDNWGQGTSVTVSS	
103H 2B4	QVQLQQPGAEPVKPGASVKLSCKASGYSFT NFLTHWVRQRPQGQGLEWIGE INPTNGRTYYNEKFKRKATLTVDKSSTTVYM QLSNLTPEDSAVFYCARIY YGNSMDYWGQGTSLVTVSA	1 68
103F 6D3	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFP TYSIHWLKQGPQGQGLEWIGY INPNTIYTNYNQKFYKTTLTADKSSSTAYIQL SSLTSDDSAVYYCAREG YGRGNAMDYWGQGTSLVTVSS	1 69
113E 12F7	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVTGFSLS YGVHWVRQPPGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSALMSRLSISKDRSKSQVFLK MTSLQTDDTAMYYCARSLY GNSFDHWGQGTTLTVSS	1 70
120B 7B2	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT GYIIQWMKQKPGLGLEWIGF INPYNDGTKYNEQFKGKATLTSDKSSNAAY MELSSLTSEDSAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTSLVTVSA	1 71
111B 12D11	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTS YGVHWVRQPPGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSTLMSRLSISKDRSKSQVFLK MTSLQTDDTAMYYCARSLY	1 72

	GNSFDHWGQGTTTLTVSS	
111E 7E2	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTS YGAHWVRQPPGKGLEWLGV IWAGGSTNYDSALMSRLSISKDRSKSQVFLK MTSLQTDDTAMYYCARSLY GNSFDHWGQGTTTLTVSS	1 73
100F 4G12	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT GFLMHVVKQKPGQGLEWIGY INPYNDGTKYSERFKGKATLTSDKSSSTAYM ELSSLTSDDSAVYYCARLD YGNAMDYWGQGTSTVTVSS	1 74

Ejemplo 3. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales reactivos a CLD18A2

[0167] Para producir cantidades de mg de anticuerpo para la caracterización funcional, se sembraron células de hibridoma en biorreactores con base en diálisis (CELLine CL1000, Integra, Chur, CH) a 2×10^6 células/mL. Se recopiló el sobrenadante que contiene el anticuerpo una vez a la semana. Cada anticuerpo monoclonal de ratón se purificó usando Melon Gel (Pierce, Rockford, USA) y se concentró mediante precipitación de sulfato de amonio. La concentración y la pureza del anticuerpo se calcula mediante electroforesis de gel de dodecilsulfato de sodio y tinción coomassie.

Ejemplo 4. Unión de los anticuerpos monoclonales murinos reactivos a CLD18A2

[0168] Las células MKN45 que sobreexpresaron CLD18A2 se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos primarios indicados como la **Figura 3** en diluciones seriales de 3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos

veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que el anticuerpo murino purificado puede unirse a células MKN45 transfectadas con CLD18A2 humana mediante citometría de flujo con EC50 alta, en comparación con el anticuerpo de referencia positivo.

Ejemplo 5. Unión de los anticuerpos monoclonales murinos reactivos a CLD18A2 mutante

[0169] Las células SU620 que expresaron de forma endógena CLD18A2 que portaban la mutación M149L se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos primarios indicados como la **Figura 4** en diluciones seriales de 3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que el anticuerpo murino purificado puede unirse a SU620 células que expresan de forma endógena CLD18A2 humana que portan la mutación de M149L mediante citometría de flujo con EC50 alta, mientras que el anticuerpo de referencia no lo hizo (**Figura 4**).

Ejemplo 6. Unión de los anticuerpos monoclonales murinos reactivos a CLD18A2 de ratón y de macaco cangrejero

[0170] Para evaluar las R actividades cruzadas de los anticuerpos con CLD18A2 de ratón y de macaco cangrejero, las células HEK293 que sobre expresaron CLD18A2 humana, de ratón o de macaco cangrejero se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos primarios indicados como la Figura 3 en diluciones seriales de

3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos murinos purificados pueden unirse a CLD18A2 de ratón y de macaco cangrejero mediante citometría de flujo con EC50 alta, al menos similar a los anticuerpos de referencia (**Figura 5, 6 y 7**).

Ejemplo 7. Unión de anticuerpos quiméricos reactivos a CLD18A2

[0171] Se produjeron los genes de VH y VK murino de manera sintética y luego se clonaron respectivamente en los vectores que contienen los dominios constantes de gamma 1 y kappa humanos. Se produjeron los anticuerpos quiméricos purificados a partir de las células CHO transfectadas.

[0172] Las células MKN45 que expresaron de manera estable CLD18A2 humana o CLD18A1 se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos quiméricos primarios indicados como la **Figura 4** en diluciones seriales de 3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos quiméricos pueden unirse a CLD18A2 humana con EC50 alta, pero no CLD18A1 (**Figura 8 y 9**).

Ejemplo 8. Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) de anticuerpos quiméricos

[0173] El bioensayo informante de ADCC utiliza una lectura alternativa en un punto más temprano en la activación de la vía MOA de ADCC: la activación de la transcripción genética mediante la vía de NFAT (factor nuclear

de las células T activadas) en la célula efectora. Además, el bioensayo informante de ADCC utiliza células Jurkat diseñados que expresan de manera estable el receptor FcγRIIIa, la variante V158 (alta afinidad), y un elemento de respuesta de NFAT que impulsa la expresión de la luciferasa de luciérnaga como células efectoras. La actividad biológica del anticuerpo en ADCC MOA se cuantifica mediante la luciferasa producida como resultado de activación de la vía NFAT; actividad de luciferasa en la célula efectora se cuantificó con lectura de luminiscencia (**Figura 1**). La señal fue alta, y el fondo de ensayo fue bajo.

[0174] Las diluciones seriales de anticuerpo monoclonal quimérico de claudina 18.2 o Ref. Ab se incubaron durante 6 horas de la inducción a 37 °C con células efectoras Jurkat diseñadas (células efectoras de bioensayo de ADCC), con o sin células efectoras de bioensayo de ADCC (que expresan claudina 18.2). La actividad de luciferasa se cuantificó con el reactivo Bio-Glo™ (**Tabla 2**). Los resultados muestran que estos anticuerpos quiméricos tienen actividades de ADCC muy fuertes.

Tabla 2. EC50 de los anticuerpos evaluados

Completo	EC50 (pM)
4F11E2	22,18
12F1F4	36,77
64G11B4	125,7
72C186A3	46,32
78E8G9G6	15,86
103F6D3	79,53
120B7B2	5,806
Ref. Ab	458,5

Ejemplo 9. Humanización de los mAb 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 de ratón

[0175] Los genes de la región variable 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 de mAb se emplearon para crear MAb humanizados. En el primer paso de este proceso, las secuencias de aminoácidos de VH y VL de MAb se compararon con la base de datos disponibles de las secuencias del gen de Ig humana para buscar las secuencias generales del gen de Ig de la línea germinal humana que mejor coincide.

[0176] Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos humanizados se enumeran en la **Tabla 3** a continuación.

Tabla 3. Secuencias humanizadas

Nom bre	Secuencia	S EQ ID NO:
4F11 VH_1 (VH injertado)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST FGMHWVRQAPGKGLEWVS Y ITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLVTVSS	1 75
4F11 VH_2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST FGMHWVRQAPGKGLEWVAY ITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLVTVSS	1 76
4F11 VH_3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFST FGMHWVRQAPGKGLEWVAY ITSGNSPIYFTDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSS	1 77

	YYGNSMDYWGQGT LVT VSS	
4F11 VL_1 (VL injertado)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLNS GNRKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNAYS PFTFGGGTKLEIK	1 78
4F11 VL_2	DTVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLN SGNRKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCQNAYS PFTFGGGTKLEIK	1 79
4F11 VL_3	DTVMTQSPDSLAVSLGERVTLNCRSSQSLLN SGNRKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCQNAYS PFTFGGGTKLEIK	1 80
72C 1VH_1 (VH injertado)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYPEWVRQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDTSASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGT LVT VSS	1 81
72C 1VH_2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFT TYPEWVRQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTITVDTSASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGT LVT VSS	1 82

72C 1VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFT TYPEIWMKQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTITVDTSASTAYM EVSSLRSEDVAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGTLVTVSS	1 83
72C 1VH_4	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT TYPEIWMKQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTLTVDTASTVYL EVSSLRSEDVAVYYCARRA YGYPYAMDYWGQGTLVTVSS	1 84
72C 1VL_1 (VL injetado)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLS GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNDYIY PYTFGGGGTKLEIK	1 85
72C 1VL_2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLS GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNDYIY PYTFGGGGTKLEIK	1 86
72C 1VL_3	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCQNDYIY PYTFGGGGTKLEIK	1 87
120 B7VH_1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYIIQWVRQAPGQRLEWMGF	1 88

(VH injertado)	INPYNDGTTYNEQFKGRVTITRDTSASTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTLVTVSS	
120 B7VH_2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFT GYIIQWMRQAPGQRLEWMGF INPYNDGTTYNEQFKGRVTITSDTSASAAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTLVTVSS	1 89
120 B7VH_3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFT GYIIQWMKQAPGQRLEWIGF INPYNDGTTYNEQFKGRATITSDTSASAAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTLVTVSS	1 90
120 B7VH_4	EVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT GYIIQWMKQAPGQRLEWIGF INPYNDGTTYNEQFKGRATLTSDTSASAAYM ELSSLRSEDVAVYYCARAY FGNSFAYWGQGTLVTVSS	1 91
120 B7VL_1 (VL injertado)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNS GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQNGYYF PFTFGGGTKLEIK	1 92
120 B7VL_2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNS GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQNGYYF	1 93

	PFTFGGGTKLEIK	
120 B7VL_3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNS GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSGQAEDVAVYFCQNGYYF PFTFGGGTKLEIK	1 94
120 B7VL_4	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSGQAEDVAVYFCQNGYYF PFTFGGGTKLEIK	1 95

[0177] Se produjeron los genes de VH y VL humanizados de manera sintética y luego se clonaron respectivamente en los vectores que contienen los dominios constantes de gamma 1 y kappa humanos. El emparejamiento de VH humano y VL humano creó los anticuerpos humanizados (véase la **Tabla 4**).

Tabla 4. Anticuerpos humanizados con sus regiones VH y VL

4F11E2

VH VL	4F11VH_1	4F11VH_2	4F11VH_3
4F11VL_1	hu4F11.1	hu4F11.4	hu4F11.7
4F11VL_2	hu4F11.2	hu4F11.5	hu4F11.8
4F11VL_3	hu4F11.3	hu4F11.6	hu4F11.9

72C1B6A3

VH VL	72C1VH_1	72C1VH_2	72C1VH_3	72C1VH_4
72C1VL_1	hu72C1.10	hu72C1.13	hu72C1.16	hu72C1.19

72C1VL 2	hu72C1. 11	hu72C1. 14	hu72C1. 17	hu72C1. 20
72C1VL 3	hu72C1. 12	hu72C1. 15	hu72C1. 18	hu72C1. 21

120B7B2

VH VL	120B7V H_1	120B7V H_2	120B7V H_3	120B7V H_4
120B7V L_1	hu120B 7.22	hu120B 7.26	hu120B 7.30	hu120B 7.34
120B7V L_2	hu120B 7.23	hu120B 7.27	hu120B 7.31	hu120B 7.35
120B7V L_3	hu120B 7.24	hu120B 7.28	hu120B 7.32	hu120B 7.36
120B7V L_4	hu120B 7.25	hu120B 7.29	hu120B 7.33	hu120B 7.37

Ejemplo 10. Unión de anticuerpos humanizados reactivos a CLD18A2

[0178] Las células MKN45 que expresaron de manera estable CLD18A2 humana o CLD18A1 se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos humanizados primarios indicados como la Figura 4 en diluciones seriales de 3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos humanizados indicados pueden unirse a CLD18A2 humana con EC50 alta, pero no CLD18A1 (**Figura 10 y 11**).

Ejemplo 11. Unión de PTM (modificación postranslacional) anticuerpos humanizados sin peligro reactivos a CLD18A2

[0179] Las modificaciones postranslacionales (PTM) pueden provocar problemas durante la aparición de una proteína terapéutica tal como un aumento de la heterogeneidad, una reducción de la bioactividad, una reducción de la estabilidad, inmunogenia, fragmentación y agregación. El posible impacto de las PTM depende de su ubicación y, en algunos casos, de la exposición del solvente. Las CDR de la secuencia se analizaron para las siguientes PTM potenciales: desamidación de asparagina, isomerización de aspartato, grupos tiol de cisteína libre, N-glucosilación, oxidación, fragmentación mediante el sitio de hidrólisis potencial, etc.

[0180] Para reducir el riesgo de crear PTM en 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2, algunos aminoácidos implicados en VH y VL se mutaron. Y luego se generaron nueve anticuerpos:

Clones	HC:LC*	N.º
4F11E2	HC N55Q-LC N31E	1
	HC N55Q-LC S32A	2
	HC N55E-LC S32A	3
	HC N55E&N104Q-LC S32A	8
	HC N55E&N104E-LC S32A	9
	HC N55E&S105A-LC S32A	10
72C1B6A3	HC WT-LC N31E	4
	HC WT-LC S32A	5
120B7B2	HC G57D&S104A-LC-N96E&N31E	6
	HC G57D&S104A-LC-S32A&G97A	7

* La ubicación de aminoácidos (p. ej., N55) según el número de residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos VH o VL correspondiente, no Kabat o Chotia.

C ompleto	Muta nte	Secuencia (mutación resaltada)	EQ ID NO:
4 F11E2	HC N55Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSG <u>Q</u> SPIYFTDTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLVTVSS	96
	HC N55E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYGNSMDYWGQGTLVTVSS	97
	HC N55E & N104Q	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYG <u>Q</u> SMDYWGQGTLVTVSS	98
	HC N55E & N104E	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYG <u>E</u> SMDYWGQGTLVTVSS	99
	HC N55E & S105A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSTFGMHWVRQAPGKGLEWVS YITSG <u>E</u> SPIYFTDTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSS	00

		YYGN <u>A</u> MDYWGQGT ¹ LVTVSS	
	LC N31E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR SSQSLL <u>E</u> SGNRKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTIS ² SLQAEDVAVYYCQNAYS PFTFGGGTKLEIK	01
	LC S32A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCR SSQSLLN <u>A</u> GNRKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTIS ² SLQAEDVAVYYCQNAYS PFTFGGGTKLEIK	02
7 2C1B6A 3	HC WT	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTTYPIEWVRQAPGQRLEWMGN FHPYNDDTKYNEKFKGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSED ³ TA ⁴ VYYCARRA YGY ⁵ PYAMDYWGQGT ¹ LVTVSS	81
	LC S32A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLN <u>A</u> GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTIS ² SLQAEDVAVYYCQNDYIY PYTFGGG ⁶ TKLEIK	03
	LC N31E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLL <u>E</u> SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYRASSRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTIS ² SLQAEDVAVYYCQNDYIY PYTFGGG ⁶ TKLEIK	04
1 20B7B2	HC G57D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTGYIIQWVRQAPGQRLEWMGF	05

	&S10 4A	INPYND <u>D</u> TKYNEQFKGRVTITRDT SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAY FGN <u>A</u> FAYWGQGTLTVSS	
	LC- S32A &G97 A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLN <u>A</u> GNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQN <u>A</u> YYF PFTFGGGTKLEIK	06
	LC- N96E &N31 E	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLL <u>E</u> SGNQKNYLTWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ <u>E</u> GYFF PFTFGGGTKLEIK	07

[0181] Las células MKN45 que expresaron de manera estable CLD18A2 humana o CLD18A1 se recopilaron a partir de frascos. Se incubaron 100 μ L de 1×10^6 células/mL de células con los anticuerpos humanizados primarios indicados como la Figura 4 en diluciones seriales de 3 pliegues comenzando desde 100 nM a 0,003 nM durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con 200 μ L de tampón de FACS dos veces, se incubaron las células con un anticuerpo secundario durante 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con 200 μ L de tampón de FACS dos veces y se transfirieron a un tubo de BD Falcon 5 mL y se analizaron mediante FACS. Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos indicados pueden unirse a CLD18A2 humana con EC50 alta, pero no CLD18A1 (**Figura 12 y 13**).

[0182] Para evaluar las variantes sin riesgo la potencia de unión al antígeno de 4F11E2d (HC N55E/LC S32A) y 4F11E2d (H N55E N104Q/LC S32A), las variantes se evaluaron en un ensayo de unión con base en células. Los anticuerpos anti-CLDN18.2 diluidos serialmente, comenzando desde

100 nM, se incubaron con 10^5 células durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con el tampón de FACS, luego las células se incubaron con un anticuerpo secundario etiquetado con APC durante otros 30 minutos en hielo. Se analizaron las células unidas con anticuerpos mediante FACS. Las variantes mostraron una unión potente a la claudina 18.2 de superficie celular (**Figura 14**).

Ejemplo 12. Citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) de anticuerpos humanizados sin riesgo de PTM

[0183] Las diluciones seriales de anticuerpos humanizados sin riesgo de PTM de claudina 18.2 o Ref. Ab se incubaron durante 6 horas de la inducción a 37 °C con células efectoras Jurkat diseñadas (células efectoras de bioensayo de ADCC), con o sin células efectoras de bioensayo de ADCC (que expresan claudina 18.2). La actividad de luciferasa se cuantificó con el reactivo Bio-Glo™ (Tabla 5). Los resultados muestran que estos anticuerpos humanizados tienen actividades de ADCC muy fuertes.

Tabla 5. ADCC

N.º	Anticuerpo evaluado	EC50 (pM)
1	4F11E2 -HC N55Q-LC N31E	238,1
2	4F11E2 -HC N55Q-LC S32A	413,9
3	4F11E2 -HC N55E-LCS32A	148,1
4	72C1B6A3-HC WT-LC N31E	1651
5	72C1B6A3-HC WT- LCS32A	190,5
6	120B7B2-HC G57D&104A- LC-N96E&N31E	492,6
7	120B7B2-HC G57D&104A- LC-S32A&G97A	113,9
Ref. Ab	Ref. Ab	158,3

Ejemplo 13. Mapeo del epítipo

[0184] Todos los aminoácidos del dominio extracelular de claudina 18.2 se mutaron individualmente a A. Cada claudina 18.2 mutada o natural se transfectó en las células Hek293. La expresión de claudina 18.2 se evaluó mediante los anticuerpos indicados. Los resultados se muestran en la Figura 15 (se muestran únicamente los residuos de aminoácidos en los que la mutación redujo las uniones).

[0185] Como se muestra en la **Figura 15**, aminoácidos W30, N45, Y46, G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56, S58, F60, E62, C63, R80, Y169, y G172 están implicados en la unión de tres anticuerpos evaluados, 4F11E2 (H4F), 72C186A3 (H72C1) y 120B7B2 (120), o el anticuerpo de referencia 175D10 (IMAB362). W30 aparece para formar un grupo de residuos en la primera mitad del primer dominio extracelular de la proteína de claudina 18.2. N45, Y46, G48, L49, W50, C53, V54, R55, E56, S58, F60, E62 y C63 parecieron ser un segundo grupo de residuos dentro del mismo dominio extracelular. Y169 y G172, por otro lado, están ubicados en el segundo dominio extracelular o cerca de este.

[0186] Se han resuelto las estructuras de cristal de varias proteínas de claudina. Como se muestra en la **Figura 20** (adaptado de Suzuki *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1397: 25-34), las proteínas de claudina incluyen cuatro segmentos transmembranaarios, un N-terminal intracelular corto, una primera horquilla extracelular grande (horquilla 1, o ECS1) que contiene un motivo W-LW-C-C de consenso, una segunda horquilla extracelular más corta (horquilla 2, o ECS2), y un extremo C-terminal intracelular. La horquilla 1 incluye cuatro cadenas β , β 1, β 2, β 3 y β 4, y las horquillas incluyen una cadena β , β 5.

[0187] Las mutaciones de W30, L49 y W50 a alanina probablemente desestabilicen la conformación de horquilla 1. Es probable que la mutación de C53 o C63 rompa el enlace de disulfuro entre β 3 y β 4. R80 es probablemente importante para mantener la interacción entre moléculas paralelas de claudina 18.2 en la superficie celular, o para estabilizar la

conformación de la horquilla 1. Los residuos restantes, incluidos N45, Y46, G48, V54, R55, E56, S58, F60, y E62 (en la horquilla $\beta 3$ a $\beta 4$), e Y169 y G172 (en $\beta 5$), probablemente presenten la interfaz para la unión a los anticuerpos evaluados en el presente documento.

Ejemplo 14. La comparación de los anticuerpos 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 humanizados con el anticuerpo 175D10 claudina 18.2 de referencia

Unión con base en la célula

[0188] Para comparar los anticuerpos anti-claudina 18.2 humanizados: 4F11E2 (HC N55E/LC S32A), 72C1B6A3(HC WT/ LC S32A) y 120B7B2 (HC G57D S104A/LC S32A G97A) al anticuerpo 175D10 (IMAB362) de referencia, este ejemplo determinó la unión con base en células en las células expresadas por claudina 18.2 humana. Las células CHO-K1 que expresaron de manera estable la CLD18A2 humana se clasificaron para un expresor alto y expresor bajo según el contenido de expresión de CLDN18.2 humana. Los anticuerpos anti-CLDN18.2 diluidos serialmente, comenzando desde 100 nM, se incubaron con 10^5 células durante 30 minutos en hielo. Después de lavarse con el tampón de FACS, luego las células se incubaron con un anticuerpo secundario etiquetado con APC durante otros 30 minutos en hielo. Se analizaron las células unidas con anticuerpos mediante FACS.

[0189] Como se muestra en la **Figura 16**, 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 mostraron una unión superior a 175D10 en ambas, células CHO-K1 de claudina 18.2 alta y baja.

Ensayo ADCC

[0190] Para comparar aún más el efecto de ADCC de anticuerpos anti-claudina 18.2 humanizados: 4F11E2 (HC N55E/LC S32A), 72C1B6A3(HC WT/ LC S32A) y 120B7B2 (HC G57D S104A/LC S32A G97A) al anticuerpo 175D10 (IMAB362) de referencia, este ejemplo realizó un ensayo de ADCC con base en células. En breve, las células NK92 se cocultivaron con células 293

sobreexpresadas por claudina 18.2 en la presencia de anticuerpos anti-claudina 18.2 de dosis diferentes. Como se muestra en la **Figura s17**, 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 mostraron una potencia superior de ADCC al anticuerpo 175D10.

[0191] Para determinados anticuerpos terapéuticos, el ADCC potenciado puede aumentar el periodo terapéutico a la terapia dirigida según el anticuerpo. El ADCC potenciado puede lograrse a través del diseño de la región Fc tal como con las mutaciones de S239D/I332E. En un ensayo ADCC con base en células NK92, los anticuerpos 4H11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 con mutaciones de S239D/I332E en la región Fc mediaron la destrucción de la célula mediada por NK92 más potente de células 293 sobreexpresadas por claudina 18.2 en comparación con el anticuerpo 175D10 de control con las mismas mutaciones de S239D/I332E (**Figura 18**).

Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP)

[0192] El efecto de los mAb anti-CLDN 18.2 en la fagocitosis de la célula tumoral mediante macrófagos se evaluó en un ensayo *in vitro* en el que las células NUG-C4 positivas en CLDN18.2 se cocultivaron con macrófagos diferenciados humanos en la presencia de una concentración diferente de los mAb anti-CLDN18.2. En breve, se purificaron los monocitos CD14+ a partir de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y diferenciadas *in vitro* en macrófagos maduros durante 6 días. Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) se recopilaron y volvieron a poner en placas en platos de 24 pocillos durante la noche como células efectoras. CLDN 18.2-eGFP que expresan NUG-C4 como células efectoras que se añadieron a los MDM en una proporción de 5 células tumorales por fagocitos en la presencia de diferentes concentraciones de mAb anti-CLDN18.2. Después de 3 horas de incubación, las células efectoras no fagocitadas se lavaron con PBS y el resto de los fagocitos se recopilaron y tiñeron con CD14 marcador del macrófago seguido del análisis de citometría de flujo. Se calculó el índice de fagocitosis al cuantificar el

porcentaje de las células GFP+ en las células CD14+, normalizadas las del control de la IgG.

[0193] Como se muestra en la **Figura 19**, todos los mAb C18.2 aumentaron significativamente la fagocitosis de las células NUG-C4 en una manera dependiente de la concentración. En los dos formatos de IgG1 natural e IgG1 mutada por S239D/I332E, los anticuerpos 4H11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 mostraron un efecto ADCP más potente que el anticuerpo 175D10 de referencia.

[0194] Juntos, este ejemplo muestra que el los anticuerpos 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2 de aparición reciente tuvieron una unión con base en células y potencia de ADCC/ADCP más potentes que el anticuerpo 175D10 de referencia. Se contempla que las propiedades mejoradas de estos anticuerpos pueden atribuirse a la especificidad de unión más elevada de estos anticuerpos en comparación con las del anticuerpo 175D10 de referencia. Por ejemplo, la interacción de 175D10 con claudina 18.2 es potente en todo el espectro en la **Figura 15**, que incluye la unión potente a D28, Q33, N38 y V43, y luego G59 y V79. Los nuevos anticuerpos, 4F11E2, 72C1B6A3 y 120B7B2, por contraste, tienen una especificidad más alta a W30 dentro de la primera mitad del primer dominio extracelular, y una especificidad más alta a G48 hasta E56 dentro de la segunda mitad del primer dominio extracelular. Los nuevos anticuerpos también tienen una unión levemente más potente a Y46 que también está la segunda mitad. Su unión a D28, Q33, N38, V43, G59 y V79 es considerablemente más débil, lo que es probable que contribuya a ADCC y ADCP mejorados de los nuevos anticuerpos.

Ejemplo 15: conjugación de pHAb a anticuerpos de claudina 18.2

[0195] La internalización de anticuerpos anti-claudina 18.2 unidos a CLDN18.2 se determinó usando tintes reactivos de pHAb según el ensayo de internalización. Los tintes de pHAb son tintes de sensor de pH que tienen una fluorescencia muy baja en un pH >7 y un aumento muy alto en la fluorescencia

a medida que el pH de la solución se vuelve ácido. Los tintes de pHAb tienen una excitación máxima (Ex) a 532 nm y una emisión máxima (Em) a 560 nm. Los anticuerpos conjugados con el tinte de pHAb pueden usarse para monitorear la internalización del anticuerpo mediado por el receptor. Cuando un conjugado de anticuerpo-tinte de pHAb se une a su receptor en la membrana celular, muestra una fluorescencia mínima. Sin embargo, en la internalización mediada por el receptor, los conjugados anticuerpo-tinte de pHAb transitan hasta el endosoma y vesículas lisosomales donde el pH es ácido, lo que provoca que el tinte de pHAb Dye haga fluorescencia. Esta fluorescencia se puede detectar usando varias técnicas, incluido el diagnóstico por imágenes de células, citometría de flujo y lectores con base en placas fluorescentes con filtros adecuados.

[0196] Protocolo experimental:

[0197] A. Producción de anticuerpos

[0198] 27 anticuerpos quiméricos, 3 anticuerpos humanizados y una IgG1 de control se produjeron al transfectar de manera transitoria las células ExpiCHO y purificar mediante cromatografía por afinidad de la proteína A.

[0199] B. Conjugación del anticuerpo en la perla usando el tinte reactivo tiol de pHAb

[0200] 1. Agitar suavemente o utilizar un mezclador de extremo a extremo para volver a suspender de manera uniforme las perlas de la proteína A AmMag® (LC00695). Mantener uniforme la suspensión cuando se forman alícuotas de perlas.

[0201] 2. Añadir 50 µL de lechada de perlas a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos.

[0202] 3. Retirar y descartar el tampón de almacenamiento.

[0203] 4. Añadir 250 µL de PBS (pH 7,4). Mezclar y colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar y descartar el tampón.

[0204] 5. Añadir 1,0 mL de la muestra que contiene 100 µg de anticuerpo a las perlas.

[0205] 6. Mezclar la muestra durante 60 minutos a temperatura ambiente. Mantener las perlas en suspensión al mezclar continuamente

[0206] 7. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar el sobrenadante.

[0207] 8. Añadir 250 µL del tampón de conjugación de tiol (10 mM de tampón de fosfato que contiene 1 mM de EDTA, pH 7,0) y mezclar. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar y descartar el tampón. Repetir este paso por dos lavados en total.

[0208] 9. Añadir 100 µL del tampón de conjugación de tiol.

[0209] 10. Añadir DTT a una concentración final de 2,5 mM.

[0210] 11. Mezclar la muestra durante 60 minutos a temperatura ambiente. Mantener las perlas en suspensión al mezclar continuamente

[0211] 12. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos y descartar el tampón.

[0212] 13. Añadir 250 µL del tampón de conjugación de tiol y mezclar. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar y descartar el tampón. Repetir este paso por dos lavados en total.

[0213] 14. Añadir 100 µL del tampón de conjugación de tiol.

[0214] 15. Centrifugar rápidamente el tinte reactivo tiol de pHAb (G9835) (es decir, 14,000 × g en una centrífuga de mesa durante 5 a 10 segundos) y disolver a 10 mg/mL al añadir 25 µL de 1:1 de la mezcla DMSO-agua a 0,25 mg de tinte. Mezclar mediante la formación de vórtices. Puede llevar de 1 a 3 minutos que el tinte se disuelva completamente. Mezclar esta solución justo antes de usar.

[0215] 16. Añadir 1,2 µL de tinte reactivo tiol de pHAb para 100 µg de anticuerpo para crear un exceso de 20 molar de tinte.

[0216] 17. Mezclar durante 60 minutos. Mantener las perlas en suspensión al mezclar continuamente

[0217] 18. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar y descartar el sobrenadante. 19. Añadir 250 µL del tampón de conjugación de tiol y mezclar. Colocar en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar y descartar el tampón de unión/lavado (PBS.pH 7,4).

[0218] 20. Repetir el paso 19 por dos lavados en total.

[0219] 21. Añadir 100 µL del tampón de elución (0,1 M de glicina, pH 3,0) a las perlas.

[0220] 22. Mezclar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

[0221] 23. Colocar el tubo en el soporte magnético durante 10 segundos. Retirar la muestra eluida y transferir a un nuevo tubo de microcentrífuga que contiene 5 µL de tampón de neutralización (1 M de Tris-HCl, pH 9,0).

[0222] La concentración del anticuerpo y proporción de tinte a anticuerpo (DAR), pero los anticuerpos evaluados se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Proporción de tinte a anticuerpo (DAR)

Clon	DA R
64G11B4	2,5
65G8B8	4,2
56E8F10F4	3,2
44F6B11	3,0
15C2B7	3,0
20F1E10	2,7
58G2C2	3,1
101C4F12	2,4
103A10B2	3,5

78E8G9G6	2,3
10G7G11	3,1
12F1F4	2,4
78C10B6G4	2,9
119G11D9	3,2
113G12E5E6	2,9
116A8B7	2,6
105F7G12	2,8
84E9E12	2,8
103F4D4	2,1
110C12B6	2,8
85H12E8	3,8
103H2B4	2,7
103F6D3	3,1
113E12F7	3,9
111B12D11	2,7
111E7E2	3,5
100F4G12	3,0
4F11E2 HC N55E-LC S32A (BG2001-C)	3,0
72C1B6A3 HC WT-LC S32A(BG2001-D)	2,6
120B7B2 HC G57D&S104A-LC S32A&G97A (BG2001-E)	3,0
IMAB362 (Ref. Ab)	3,3
IgG (Control)	2,9

Ejemplo 16: Detección de la internalización de los anticuerpos de claudina 18.2

[0223] Se recopilaron las células MKN45 de CLDN18.2 humanas transfectadas de manera estable con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054) y se colocaron en placas en una placa negra de 96 pocillos (Thermo

Scientific N.º 165305) en una densidad de 20 K cada 90 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 20 a 24 h antes del tratamiento con los anticuerpos etiquetados con pHAb.

[0224] Para la internalización, los anticuerpos claudina 18.2 conjugados con pHAb se añadieron a las células en dos concentraciones (20 nM y 100 nM) y se mezclaron suavemente durante 1 a 2 min en un mezclador de placas y luego se incubaron durante la noche para permitir la internalización (la internalización puede detectarse en unas pocas horas). Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente a Ex/Em: 532 nm/560 nm en un Tecan Infinity M1000 Pro. Para lograr una sensibilidad mayor, se reemplazó el medio por PBS antes de leer la placa.

[0225] Los resultados normalizados por DAR se muestran en la **Tabla 7**. Las eficiencias de internalización de los anticuerpos evaluados fueron mayores que el anticuerpo IMAB362 de referencia.

Tabla 7. Resultados de internalización

Clon	Fluorescencia	
	20nM	100nM
64G11B4	24030	33742
65G8B8	15101	20466
56E8F10F4	19865	28672
44F6B11	18438	26089
15C2B7	19400	33174
20F1E10	21146	45093
58G2C2	18645	33059
101C4F12	15179	44394
103A10B2	11998	31328
78E8G9G6	26815	41148
10G7G11	9603	35549

12F1F4	29457	43854
78C10B6G4	16190	29146
119G11D9	21438	34049
113G12E5E6	11003	28896
116A8B7	21356	41720
105F7G12	14848	43122
84E9E12	18710	35080
103F4D4	31176	49098
110C12B6	19335	40139
85H12E8	19710	29070
103H2B4	23459	35834
103F6D3	23023	41266
113E12F7	13181	29861
111B12D11	15926	37384
111E7E2	12335	28040
100F4G12	17093	33537
4F11E2 HC N55E-LC S32A (BG2001-C)	19008	28208
72C1B6A3 HC WT-LC S32A (BG2001-D)	26203	36535
120B7B2 HC G57D&S104A- LC S32A&G97A (BG2001-E)	19204	31321
IMAB362 (Ref. Ab)	7951	18907
IgG (Control)	854	2705

Ejemplo 17: EC50 de internalización de anticuerpos claudina 18.2 quiméricos en las células CHO-claudina 18.2

[0226] Se recopilaron las células CHO de CLDN18.2 humanas transfectadas de manera estable con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-

054) y se colocaron en placas en una placa negra de 96 pocillos (Thermo Scientific N.º 165305) en una densidad de 10 K cada 90 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 20 a 24 h antes del tratamiento con los anticuerpos etiquetados con pHAb.

[0227] Para la internalización, los anticuerpos claudina 18.2 quiméricos conjugados con pHAb se añadieron a las células en diferentes concentraciones (100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,03 nM y 0,01 nM) y se mezclaron suavemente durante 1 a 2 min en un mezclador de placas y luego se incubaron durante la noche para permitir la internalización (la internalización puede detectarse en unas pocas horas). Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente a Ex/Em: 532 nm/560 nm en un Tecan Infinity M1000 Pro. Para lograr una sensibilidad mayor, se reemplazó el medio por PBS antes de leer la placa.

[0228] Los resultados normalizados con DAR se muestran en la **Figura 21**. Nuevamente, las eficiencias de internalización de los anticuerpos evaluados fueron mayores que el anticuerpo IMAB362 de referencia.

Ejemplo 18: EC50 de internalización de anticuerpos claudina 18.2 humanizados en las células CHO-claudina 18.2

[0229] Se recopilaron las células CHO de CLDN18.2 humanas transfectadas de manera estable con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054) y se colocaron en placas en una placa negra de 96 pocillos (Thermo Scientific N.º 165305) en una densidad de 10 K cada 90 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 20 a 24 h antes del tratamiento con los anticuerpos etiquetados con pHAb.

[0230] Para la internalización, los anticuerpos claudina 18.2 humanizados conjugados con pHAb se añadieron a las células en diferentes concentraciones (100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,03 nM y 0,01 nM) y se mezclaron suavemente durante 1 a 2 min en un mezclador de placas y luego se incubaron durante la noche para permitir la internalización (la

internalización puede detectarse en unas pocas horas). Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente a Ex/Em: 532 nm/560 nm en un Tecan Infinity M1000 Pro. Para lograr una sensibilidad mayor, se reemplazó el medio por PBS antes de leer la placa.

[0231] Los resultados normalizados con DAR se muestran en la **Figura 22**, que muestra que las eficiencias de internalización de los anticuerpos evaluados fueron mayores que el anticuerpo IMAB362 de referencia.

Ejemplo 19: EC50 de internalización de anticuerpos claudina 18.2 humanizados en las células MKN45-claudina 18.2

[0232] Se recopilaron las células MKN45 de CLDN18.2 humanas transfectadas de manera estable con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054) y se colocaron en placas en una placa negra de 96 pocillos (Thermo Scientific N.º 165305) en una densidad de 10 K cada 90 µl por pocillo. Se incubaron las placas durante 20 a 24 h antes del tratamiento con los anticuerpos etiquetados con pHAb.

[0233] Para la internalización, los anticuerpos claudina 18.2 humanizados conjugados con pHAb se añadieron a las células en diferentes concentraciones (100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM, 0,1 nM, 0,03 nM y 0,01 nM) y se mezclaron suavemente durante 1 a 2 min en un mezclador de placas y luego se incubaron durante la noche para permitir la internalización (la internalización puede detectarse en unas pocas horas). Las placas se leyeron en un lector de placas fluorescente a Ex/Em: 532 nm/560 nm en un Tecan Infinity M1000 Pro. Para lograr una sensibilidad mayor, se reemplazó el medio por PBS antes de leer la placa.

[0234] Los resultados normalizados con DAR se muestran en la **Figura 23**, que muestra que las eficiencias de internalización de los anticuerpos evaluados fueron mayores que el anticuerpo IMAB362 de referencia.

Ejemplo 20: Conjugados de fármaco anticuerpo

[0235] Cada anticuerpo se mezcló con, aproximadamente, TCEP de 3 pliegues y se agitó durante 2 h a 37 °C. El sistema de reacción cayó rápidamente en ocho veces para VC-MMAE y se incubó durante 1 h en hielo, y exceso de 20 veces de cisteína se añadió en el conector del fármaco para extinguir la reacción. Finalmente, se purificó el producto ADC mediante elución a través de Sephadex G-25 equilibrado en PBS y se concentró mediante ultrafiltración centrífuga. El conjugado se filtró a través de un filtro de 0,2 µm en condiciones estériles y se almacenó a -80 °C para el análisis y la evaluación. Se analizó la proporción de fármaco/anticuerpo mediante espectrometría de UV, el contenido de monómero mediante SEC-HPLC y contenido de fármaco libre mediante RP-HPLC. El (DAR) de los anticuerpos conjugados con vcMMAE se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. DAR de anticuerpos conjugados con vcMMAE

Anticuerpos	DAR
4F11E2 HC N55E-LC S32A	3,76
72C1B6A3 HC WT-LC S32A	3,93
IMAB362 (Ref. Ab)	4,00
IgG1 (Control)	3,81

Ejemplo 21: Afinidades y especificidades de unión relativas de anticuerpos anti-CLDN18.2 no marcados y conjugados de fármaco anticuerpo

[0236] Este ejemplo determinó las afinidades y especificidades de unión relativas de anticuerpos anti-CLDN18.2 no marcados y conjugados de fármaco anticuerpo mediante citometría de flujo usando líneas celulares CLDN18.2 positivas y negativas.

[0237] Las células a partir del cultivo que crecen de manera exponencial se recopilaron con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054), y se recontaron usando una cámara de recuento Neubauer. Se centrifugaron las

células 5 min a 1500 rpm (468×g), se descartó el sobrenadante y las células se volvieron a suspender en el tampón FACS (PBS que contiene 2% de FCS (Gibco, 10270-106) para el análisis con los anticuerpos conjugados con toxina, PBS que contiene 2% de FCS y 2 mM de EDTA para la detección de los anticuerpos no marcados reactivos a CLDN18.2) a 2×10^6 células/mL. Se transfirieron 100 μ L de la suspensión de células por pocillo (corresponden a 2×10^5 células/pocillo) a una placa de microtítulo de fondo redondo de 96 pocillos. Después de centrifugado durante 1 min a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en el tampón de FACS que contiene anticuerpos no marcados o conjugados con toxina en concentraciones adecuadas (hasta 20 μ g/mL para la medición de afinidad relativa o 50 μ g/mL para el control de expresión) y se incubaron durante 30 a 45 min a 4 °C. (Tabla 8). Se centrifugaron las células durante 1 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. Después de que las células se lavaron tres veces con el tampón de FACS, se volvieron a suspender en el tampón de FACS que contiene IgG antihumana conjugada con APC (Jackson Immuno Research, 109-136-170) o IgG antirrátón de cabra conjugada con APC (Jackson Immuno Research, 115-136-146) o proteína L-FITC (1 μ g/mL, análisis de mAB294 quimérico) y se incubaron durante 30 min a 4 °C. (Tabla 3). Después de la incubación, se añadieron 100 μ L del tampón de FACS a cada muestra, se centrifugaron las células durante 1 min a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. El paso de lavado con el tampón de FACS se repitió dos veces. Finalmente, se volvieron a suspender las células en 100 μ L del tampón de FACS y la unión se determinó usando un bioanalizador de matriz BD FACS.

[0238] Se debe tener en cuenta que los anticuerpos no marcados y conjugados con toxinas se aplicaron en concentraciones iguales. Los resultados se muestran en la **Figura 24**.

Ejemplo 22: La toxicidad celular de anticuerpos humanizados de claudina 18.2 con MMAE es más potente que IMAB362 con MMAE en DAN-G, transfectantes de NUGC o SCG-7901

[0239] Las células que sobreexpresan claudina 18.2 humana (DAN-G, transfectantes NUGC o SCG-7901) se recopilaron con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054), se volvieron a suspender en el medio de cultivo celular y 50 μ L de la suspensión celular con la cantidad correspondiente de células se sembraron por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Después de 24 h, los anticuerpos IMAB362 conjugados con toxina o de control diluidos en un medio de 50 μ L en concentraciones adecuadas se añadieron y se cultivaron las células durante otras 72 h. El efecto de los anticuerpos humanizados de claudina 18.2 con MMAE en la viabilidad celular se determinó usando un ensayo viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7572).

[0240] El protocolo de ensayo viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7572) utilizado fue de la siguiente manera:

[0241] 1. Preparar placas de pocillos múltiples con paredes opacas con células de mamíferos en un medio de cultivo, 100 μ L por pocillo para placas de 96 pocillos o 25 μ L por pocillo para placas de 384 pocillos. Las placas con pocillos múltiples pueden ser compatibles con el luminómetro utilizado.

[0242] 2. Preparar los pocillos de control que contienen un medio sin células para obtener un valor para la luminiscencia de fondo.

[0243] 3. Añadir el compuesto de prueba a los pocillos experimentales, e incubar según el protocolo del cultivo. 4. Equilibrar la placa y sus contenidos a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos

[0244] 5. Añadir un volumen de reactivo CellTiter-Glo® igual al volumen del medio del cultivo celular presente en cada pocillo (p. ej., añadir 100 μ L de reactivo a 100 μ L de medio que contiene células para una placa de 96 pocillos, o añadir 25 μ L de reactivo a 25 μ L de medio que contiene células para una placa de 384 pocillos).

[0245] 6. Mezclar el contenido durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.

[0246] 7. Permitir la incubación de la placa a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. Nota: la causa de señales luminiscentes desiguales dentro de las placas estándar puede ser gradientes de temperatura, siembra desigual de células o efectos de borde en placas de múltiples pocillos.

[0247] 8. Registrar la luminiscencia.

[0248] Los resultados de la prueba se muestran en la **Figura 25A-C**. BG2001-C y BG2001-D ambos, cuando se conjugan con MMAE, tuvieron un gran aumento de la toxicidad en comparación con el conjugado IMAB362-NMAE de referencia, en todas las células evaluadas. Por lo tanto, estos resultados demuestran la capacidad mejorada de los anticuerpos divulgados en el presente documento en la internalización de los fármacos conjugados.

Ejemplo 23: La toxicidad celular de anticuerpos humanizados de claudina 18.2 con MMAE es más potente que IMAB362 con MMAE en SNU620 que expresan de forma endógena claudina 18.2 humana

[0249] Las células SNU620 se volvieron a suspender en un medio de cultivo celular y 50 μ L de suspensión de la célula con la cantidad correspondiente de células se sembraron por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Después de 24 h, los anticuerpos conjugados con toxina, incluido IMAB362 del anticuerpo de referencia, diluidos en un medio de 50 μ L en concentraciones adecuadas se añadieron y se cultivaron las células durante otras 72 h. El efecto de los anticuerpos humanizados de claudina 18.2 con MMAE en la viabilidad celular se determinó usando un ensayo viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7572). Como se muestra en la **Figura 26**, BG2001-C y BG2001-D ambos fueron en gran medida más eficaces en el suministro del MMAE conjugado en las células SNU620 en comparación con el

IMAB362 del anticuerpo de referencia, un anticuerpo anti-claudina 18.2 principal en desarrollo clínico.

Ejemplo 24: Eficacia *in vivo* de los conjugados de fármaco anticuerpo

[0250] Este ejemplo evaluó la eficacia de uno de los conjugados anticuerpo/fármaco (ADC), en comparación con el anticuerpo solamente (mAb), en la reducción del crecimiento tumoral en los ratones lampiños con células tumorales humanas.

[0251] Se inocularon 0,1 mL (5×10^5 células) de células derivadas de pacientes humanos (mezcladas con Matrigel 1:1) de forma subcutánea en la parte posterior derecha de cada rato. Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó los 60~80 mm³, se seleccionaron 30 ratones para experimentos de tratamiento.

[0252] 18 días después de la inoculación, 5 ratones que tenían el tamaño del tumor en el intervalo de 330-520 mm³ se seleccionaron para cada tratamiento (1 mg/kg, 3 mg/mk, 10 mg/kg o 20 mg/kg ADC, QW) durante tres semanas. Para la comparación, el tratamiento solo con el anticuerpo (mAb) fue a 10 mg/kg (BIW).

[0253] Los resultados se presentan en la Figura 27. ADC en ambos, crecimiento tumoral completamente inhibido de 10 mg/kg y 20 mg/kg, sin la disminución de los pesos corporales de los animales. La Figura 28 muestra el efecto de la reducción tumoral promedio e individual en cada animal. El efecto de la reducción tumoral del ADC, por lo tanto, es considerablemente mayor que el anticuerpo solamente.

* * *

[0254] La presente divulgación no debe limitarse en alcance mediante las realizaciones específicas descritas que tienen previsto ser ilustraciones únicas de aspectos individuales de la divulgación, y cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente están dentro del

alcance de esta divulgación. Para los expertos en la técnica será evidente que varias modificaciones y variaciones pueden elaborarse en los métodos y composiciones de la presente divulgación sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Por lo tanto, se tiene previsto que la presente divulgación cubre las modificaciones y variaciones de esta divulgación siempre que vengan dentro del alcance de las reivindicaciones anexadas y sus equivalentes.

[0255] Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria se incorporan en el presente documento a través de la referencia en la misma medida como si se indicara que cada publicación individual o solicitud de patente se incorporará específica e individualmente por la referencia.