

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 181**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14750331 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3027208**

54 Título: **Diagnóstico y terapia de cáncer que implica células madre cancerosas**

30 Prioridad:

31.07.2013 WO PCT/EP2013/002272

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

22.02.2021

73 Titular/es:

BIONTECH SE (33.3%)

An der Goldgrube 12

55131 Mainz, DE;

ASTELLAS PHARMA INC. (33.3%) y

TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES

GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ

GEMEINNÜTZIGE GMBH (33.3%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;

TÜRECI, ÖZLEM;

WALTER, KORDEN;

WAGNER, MEIKE;

KREUZBERG, MARIA;

HÄCKER, SABINE y

JACOBS, STEFAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 807 181 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y terapia de cáncer que implica células madre cancerosas

5 Las terapias convencionales contra el cáncer han intentado principalmente detectar y erradicar selectivamente las células cancerosas que crecen en gran medida rápidamente (es decir, las células que forman la masa tumoral) y ejercen sus efectos tóxicos sobre las células cancerosas en gran medida al interferir con los mecanismos celulares implicados en el crecimiento celular y replicación del ADN. Además, los regímenes de oncología estándar se han diseñado en gran medida para administrar la dosis más alta de irradiación o un agente quimioterapéutico sin toxicidad indebida, es decir, a menudo denominada "dosis máxima tolerada" (MTD).

15 Los protocolos de quimioterapia también implican a menudo la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos en un intento de aumentar la eficacia del tratamiento. A pesar de la disponibilidad de una gran variedad de agentes quimioterapéuticos, estas terapias tienen muchos inconvenientes. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos causan efectos secundarios significativos, y a menudo peligrosos, debido a efectos secundarios no específicos en las células de crecimiento rápido, ya sean normales o malignas.

20 Otros tipos de terapias contra el cáncer incluyen cirugía, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia epigenética, terapia antiangiogénesis, terapia dirigida y tratamiento con radiación para erradicar las células neoplásicas en un paciente.

Sin embargo, todos los enfoques convencionales para la terapia del cáncer tienen inconvenientes significativos para el paciente, incluida la falta de eficacia (en particular en términos de resultados a largo plazo) y toxicidad. En consecuencia, se necesitan nuevas terapias para tratar a pacientes con cáncer.

25 Cada vez hay más pruebas de que existe una subpoblación de células cancerosas dentro del tumor que retiene propiedades como las de las células madre. Esta subpoblación se denomina células madre cancerosas (CSC). Las células madre cancerosas tienen propiedades similares en comparación con las células madre normales, tienen la capacidad de autorrenovación y formación de todos los tipos de células heterogéneas de un tumor. Un ensayo potente para analizar propiedades similares a las de las CSC de las células tumorales es el ensayo de formación de colonias. Usando este ensayo, se puede examinar fácilmente la capacidad de autorrenovación y la potencia de formación de tumores de células tumorales individuales.

35 Se cree que las células madre cancerosas son capaces de iniciar la formación de tumores, mantener el crecimiento tumoral y posiblemente conducir a la diseminación tumoral a sitios de órganos distantes en el cuerpo. Las células madre cancerosas comprenden una subpoblación única de un tumor que, en relación con las células restantes del tumor (es decir, la masa tumoral), son más tumorigénicas, de crecimiento relativamente más lento o inactivas, y a menudo relativamente más quimiorresistentes que la masa tumoral. Dado que las terapias convencionales contra el cáncer se dirigen a las células que proliferan rápidamente (es decir, las células que forman la masa tumoral), se cree que estos tratamientos son relativamente ineficaces para atacar y dañar las células madre cancerosas. Las células madre cancerosas pueden expresar otras características que las hacen relativamente quimiorresistentes, tales como la resistencia a múltiples fármacos y las vías antiapoptóticas. La incapacidad para atacar y erradicar adecuadamente las células madre cancerosas constituiría una razón clave para el fracaso de los regímenes de tratamiento oncológico estándar para garantizar un beneficio a largo plazo en muchos pacientes con cáncer. Por lo tanto, las células madre cancerosas pueden no solo ser la razón principal de la recurrencia del cáncer después del tratamiento y la ineficacia de los medicamentos, sino también la razón principal de la metástasis de cáncer maligno. Por lo tanto, una oportunidad para curar el cáncer es eliminar las células madre cancerosas.

50 Las claudinas son proteínas integrales de membrana ubicadas dentro de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Se predice que las claudinas tienen cuatro segmentos transmembrana con dos bucles extracelulares y terminales N y C ubicados en el citoplasma. La familia claudina (CLDN) de proteínas transmembrana desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y también podría desempeñar un papel en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular. CLDN6 se expresa en una serie de diferentes células cancerosas humanas, mientras que la expresión en tejidos normales se limita a la placenta.

55 En el presente documento se presentan datos que demuestran que la expresión de CLDN6 está sobrerregulada durante la generación de células pluripotentes. Además, CLDN6 está fuertemente asociada con marcadores conocidos para células madre cancerosas y las células tumorales positivas para CLDN6 muestran una formación mejorada de colonias. También se demuestra que la terapia con anticuerpos específicos para CLDN6 puede superar la resistencia quimioterapéutica de tumores tales como el cáncer de ovario y la combinación de quimioterapia y terapia con anticuerpos para CLDN6 tiene un notable efecto sinérgico.

60 Los hallazgos presentados en este documento indican que CLDN6 es un marcador novedoso para células madre cancerosas y que las células madre cancerosas pueden usarse con fines diagnósticos y terapéuticos dirigidos a CLDN6. El documento WO2011/057788 A1 divulga propósitos terapéuticos dirigidos a CLDN6.

65 Sumario de la invención

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para determinar células madre cancerosas que comprende detectar células que expresan CLDN6.

En un ejemplo, la presencia de células que expresan CLDN6 indica la presencia de células madre cancerosas y/o la cantidad de células que expresan CLDN6 se correlaciona con la cantidad de células madre cancerosas. En un ejemplo, las células que expresan CLDN6 se detectan en una muestra obtenida de un paciente con cáncer tal como antes, durante y/o después del tratamiento para el cáncer. En un ejemplo, el método comprende una determinación cuantitativa y/o cualitativa de células que expresan CLDN6. En un ejemplo, el método comprende comparar la cantidad de células que expresan CLDN6 con la cantidad de células que expresan CLDN6 en una muestra de referencia o con un intervalo de referencia predeterminado. La muestra de referencia puede ser una muestra de un paciente que no ha sido diagnosticado con cáncer. El intervalo de referencia predeterminado puede basarse en una población de pacientes que no han sido diagnosticados con cáncer. En un ejemplo, el método comprende controlar la cantidad de células madre cancerosas en un paciente con cáncer, en el que el control de la cantidad de células madre cancerosas en un paciente con cáncer comprende preferiblemente comparar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra obtenida del paciente con cáncer con la cantidad de células madre cancerosas en una muestra obtenida anteriormente del paciente con cáncer. En un ejemplo, la muestra obtenida del paciente con cáncer es una muestra tomada del paciente con cáncer durante o después de la administración de la terapia contra el cáncer.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un método para controlar la eficacia de una terapia contra el cáncer en un paciente con cáncer que comprende: (i) determinar la cantidad de células madre cancerosas en una muestra obtenida del paciente con cáncer durante o después de la administración de la terapia contra el cáncer; y (ii) comparar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente con cáncer con la cantidad de células madre cancerosas en una muestra obtenida anteriormente del paciente con cáncer, en el que determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente con cáncer y/o determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra obtenida anteriormente del paciente con cáncer comprende determinar la cantidad de células que expresan CLDN6.

En un ejemplo, la muestra obtenida anteriormente del paciente con cáncer es una muestra tomada del paciente con cáncer antes, durante o después de la administración de la terapia contra el cáncer.

En un ejemplo del método de todos los aspectos, una estabilización o una disminución en la cantidad de células madre cancerosas indica que la terapia contra el cáncer es efectiva. En un ejemplo del método, un aumento en la cantidad de células madre cancerosas indica que la terapia contra el cáncer es ineficaz. En un ejemplo del método, la terapia contra el cáncer es una terapia contra el cáncer dirigida contra las células madre cancerosas. En un ejemplo, la muestra obtenida del paciente con cáncer es un fluido biológico o una biopsia tumoral. En un ejemplo, la muestra ha sido sometida a una o más etapas de pretratamiento. En un ejemplo, las células que expresan CLDN6 se detectan o su cantidad se determina detectando o determinando la cantidad de proteína CLDN6 y/o ARNm de CLDN6. En un ejemplo, las células que expresan CLDN6 se detectan o su cantidad se determina usando un inmunoensayo, en el que el inmunoensayo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en transferencias Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo y análisis por FACS. En un ejemplo, las células que expresan CLDN6 se detectan o su cantidad se determina usando un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6. En un ejemplo, las células que expresan CLDN6 son células cancerosas que expresan CLDN6 y/o son células que están presentes en un sitio tumoral.

La presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 para usar en un método de tratamiento o prevención de cáncer que comprende inhibir y/o eliminar células madre cancerosas mediante la administración del anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 en un paciente con cáncer y mediante la administración de una quimioterapia, en el que el anticuerpo y la quimioterapia se administran en cantidades sinérgicamente efectivas, en el que el anticuerpo es capaz de mediar la muerte de células que expresan CLDN6 por ADCC y/o CDC y comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y en el que la quimioterapia comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en carboplatino, gemcitabina, paclitaxel y cisplatino.

En una realización, el cáncer implica células madre cancerosas que expresan CLDN6. En una realización, la administración de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 da como resultado la inhibición o eliminación de células madre cancerosas que expresan CLDN6. En una realización, la administración de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 aumenta el efecto anticancerígeno de la quimioterapia, en la que el aumento del efecto anticancerígeno de la quimioterapia comprende preferiblemente una expansión de la vida útil de un paciente con cáncer que se somete a quimioterapia.

En una realización del método de todos los aspectos de la invención, la eliminación de células madre cancerosas da como resultado la curación del cáncer. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el

anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y la quimioterapia se administran en cantidades sinérgicamente eficaces. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, la quimioterapia se administra a una dosis que está por debajo de la dosis máxima tolerada. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, la quimioterapia comprende administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en taxanos, compuestos de platino, análogos de nucleósidos, análogos de camptotecina, antraciclinas, profármacos de los mismos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, la quimioterapia comprende administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, cisplatino, carboplatino, profármacos de los mismos, sales de los mismo y combinaciones de los mismos. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, las células madre cancerosas están en un sitio tumoral del paciente con cáncer. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el cáncer es resistente a la quimioterapia, en particular si se administra como monoterapia. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 tiene un efecto inhibitor y/o citotóxico sobre las células madre cancerosas, en el que el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 ejerce su efecto inhibitor y/o efecto citotóxico sobre las células madre cancerosas, preferiblemente por mediación de una o más de la lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 está acoplado a una fracción terapéutica y puede ser un conjugado de fármaco con anticuerpo como se divulga en el presente documento. En una realización, la fracción terapéutica es un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un radionúclido. En una realización, la fracción terapéutica actúa sobre las células de crecimiento lento. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une al primer bucle extracelular de CLDN6. En una realización del método de todos los aspectos de la invención, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento del mismo y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

Se divulga un método para tratar o prevenir el cáncer que comprende administrar un conjugado de fármaco con anticuerpo que comprende un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 unido covalentemente por un enlazador a al menos una fracción de fármaco de toxina para un paciente con cáncer.

En un ejemplo, la fracción del fármaco de toxina es permeable a la membrana celular. En un ejemplo, al menos una de las fracciones del fármaco de toxina actúa sobre las células de crecimiento lento. En un ejemplo, la fracción del fármaco de toxina es un maitansinoide o una auristatina. En un ejemplo, el maitansinoide se selecciona del grupo que consiste en DM1 y DM4. En un ejemplo, la auristatina se selecciona del grupo que consiste en monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF). En un ejemplo, el enlazador es un enlazador escindible, preferiblemente un enlazador escindible por catepsina. En un ejemplo, el anticuerpo está unido al enlazador a través de una cisteína tiol del anticuerpo.

En un ejemplo, el cáncer implica células madre cancerosas que expresan CLDN6. En un ejemplo, la administración del conjugado de fármaco con anticuerpo da como resultado la inhibición o eliminación de células madre cancerosas que expresan CLDN6. En un ejemplo, la eliminación de células madre cancerosas da como resultado la curación del cáncer. En un ejemplo, las células madre cancerosas están en un sitio tumoral del paciente con cáncer. En un ejemplo, el conjugado de fármaco con anticuerpo tiene un efecto inhibitor y/o citotóxico sobre las células madre cancerosas, en el que el conjugado de fármaco con anticuerpo ejerce su efecto inhibitor y/o citotóxico sobre las células madre cancerosas preferiblemente por inducción de apoptosis y/o inhibición de la proliferación.

En un ejemplo, el método comprende además administrar quimioterapia y/o radioterapia. En un ejemplo, la administración del conjugado de fármaco con anticuerpo mejora el efecto anticancerígeno de la quimioterapia y/o radioterapia, en el que el aumento del efecto anticancerígeno de la quimioterapia y/o radioterapia comprende preferiblemente una expansión de la vida útil de un paciente con cáncer que se somete a quimioterapia y/o radioterapia.

En un ejemplo, el conjugado de fármaco con anticuerpo y la quimioterapia se administran en cantidades sinérgicamente efectivas. En un ejemplo, la quimioterapia se administra a una dosis que está por debajo de la dosis máxima tolerada. En un ejemplo, la quimioterapia comprende administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en taxanos, compuestos de platino, análogos de nucleósidos, análogos de camptotecina, antraciclinas, profármacos de los mismos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos. En un ejemplo, la quimioterapia comprende administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, cisplatino, carboplatino, profármacos de los mismos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos. En un ejemplo, el cáncer es resistente a la quimioterapia, en particular si se administra como monoterapia.

En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse al CLDN6, en particular cuando está presente en el conjugado del fármaco con anticuerpo, tiene una afinidad y/o especificidad por el CLDN6 apropiada para permitir la endocitosis del anticuerpo y/o el conjugado del fármaco con anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 en el conjugado de fármaco con anticuerpo se une al primer bucle extracelular de

CLDN6. En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 en el conjugado de fármaco con anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

5 En un ejemplo, CLDN6 tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En un ejemplo, el cáncer comprende cáncer primario, cáncer avanzado, cáncer metastásico, cáncer recurrente o una combinación de los mismos.

10 Se divulga un método para tratar o prevenir el cáncer que comprende: (i) determinar las células madre cancerosas en un paciente con cáncer y (ii) administrar al paciente con cáncer una terapia contra el cáncer dirigida contra las células madre cancerosas. En un ejemplo, la terapia contra el cáncer dirigida contra las células madre cancerosas comprende realizar el método de tratamiento o prevención del cáncer de la invención.

15 Se divulga un método para prevenir la quimiorresistencia del cáncer, la recurrencia del cáncer o la metástasis del cáncer, en particular durante o después del tratamiento del cáncer, que comprende tratar el cáncer como se reivindica.

20 Se divulga una preparación médica para tratar o prevenir el cáncer que comprende (i) un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y (ii) un agente quimioterapéutico. El anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y el agente quimioterapéutico pueden estar presentes en la preparación médica en una mezcla o separados entre sí. La preparación médica puede estar presente en forma de un kit que comprende un primer recipiente que incluye el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y un segundo recipiente que incluye el agente quimioterapéutico. La preparación médica puede incluir además instrucciones impresas para el uso de la preparación para el tratamiento o prevención del cáncer. Los diferentes ejemplos de la preparación médica y, en particular, del anticuerpo que tiene la capacidad de unirse al CLDN6 y al agente quimioterapéutico son como se describe en el presente documento.

30 Se divulga una preparación médica que comprende (i) un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y (ii) paclitaxel. El anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y paclitaxel pueden estar presentes en la preparación médica en una mezcla o separados entre sí. La preparación médica puede ser para tratar o prevenir el cáncer, tal como el cáncer de ovario. La preparación médica puede estar presente en forma de un kit que comprende un primer recipiente que incluye el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y un segundo recipiente que incluye paclitaxel. La preparación médica puede incluir además instrucciones impresas para el uso de la preparación para el tratamiento o prevención de cáncer tal como el cáncer de ovario. Las diferentes realizaciones de la preparación médica y, en particular, del anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 son como se describe en el presente documento.

40 Se divulga un conjugado de fármaco con anticuerpo que comprende un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 unido covalentemente por un enlazador a al menos una fracción de fármaco de toxina.

45 En un ejemplo, la fracción del fármaco de toxina es permeable a la membrana celular. En una realización, al menos una de las fracciones de fármaco de toxina actúa sobre las células de crecimiento lento. En un ejemplo, la fracción del fármaco de toxina es un maitansinoide o una auristatina. En un ejemplo, el maitansinoide se selecciona del grupo que consiste en DM1 y DM4. En un ejemplo, la auristatina se selecciona del grupo que consiste en monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF). En un ejemplo, el enlazador es un enlazador escindible, preferiblemente un enlazador escindible por catepsina. En un ejemplo, el anticuerpo está unido al enlazador a través de una cisteína tiol del anticuerpo.

50 En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6, en particular cuando está presente en el conjugado de fármaco con anticuerpo, tiene una afinidad y/o especificidad por CLDN6 apropiada para permitir la endocitosis del anticuerpo y/o el conjugado de fármaco con anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 en el conjugado de fármaco con anticuerpo se une al primer bucle extracelular de CLDN6. En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 en el conjugado de fármaco con anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

60 Se divulga una formulación farmacéutica que comprende el conjugado del fármaco con anticuerpo y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65 Se divulga una preparación médica que comprende el conjugado de fármaco con anticuerpo y un agente quimioterapéutico. Preferiblemente, la preparación médica es para tratar o prevenir el cáncer. El conjugado de fármaco con anticuerpo y el agente quimioterapéutico pueden estar presentes en la preparación médica en una mezcla o separados entre sí. La preparación médica puede estar presente en forma de un kit que comprende un primer recipiente que incluye el conjugado de fármaco con anticuerpo y un segundo recipiente que incluye el agente quimioterapéutico. La preparación médica puede incluir además instrucciones impresas para el uso de la preparación

para el tratamiento o prevención del cáncer. Los diferentes ejemplos de la preparación médica, y, en particular, del conjugado de fármaco con anticuerpo y el agente quimioterapéutico son como se describe en el presente documento.

5 Se divulga una preparación médica que comprende el conjugado de fármaco con anticuerpo de la invención y paclitaxel. El conjugado de fármaco con anticuerpo y el paclitaxel pueden estar presentes en la preparación médica en una mezcla o separados entre sí. La preparación médica puede ser para tratar o prevenir el cáncer, tal como el
 10 de cáncer de ovario. La preparación médica puede estar presente en forma de un kit que comprende un primer recipiente que incluye el conjugado de fármaco con anticuerpo y un segundo recipiente que incluye paclitaxel. La preparación médica puede incluir además instrucciones impresas para el uso de la preparación para el tratamiento o prevención de cáncer tal como el cáncer de ovario. Los diferentes ejemplos de la preparación médica y, en particular, del
 15 conjugado de fármaco con anticuerpo son como se describe en el presente documento.

Se divulgan agentes y composiciones descritos en este documento, tales como el conjugado de fármaco con anticuerpo, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a CLDN6 y/o al agente quimioterapéutico para usar en los
 20 métodos descritos en este documento. Por ejemplo, la presente divulgación también proporciona el conjugado de fármaco con anticuerpo o el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 para administración junto con un agente quimioterapéutico tal como paclitaxel.

En un ejemplo, el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 es un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo. En un ejemplo, el anticuerpo media la muerte celular cuando se une al
 25 CLDN6 celular, en particular al CLDN6 expresado por las células en su superficie celular, en el que las células son preferiblemente células madre cancerosas, tales como las células madre cancerosas de los cánceres descritos en el presente documento.

Un cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón de células escamosas y adenocarcinoma, carcinoma de células grandes (LCC), cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma sinovial y carcinosarcoma, cáncer de conductos biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales que incluyen carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluido el cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y carcinoma embrionario testicular, cáncer uterino, tumores de células germinales tales como un teratocarcinoma o carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales de los testículos y el ovario, y sus formas metastásicas

40 De acuerdo con la invención, las células cancerosas y/o las células madre cancerosas que expresan CLDN6 son preferiblemente células de un cáncer descrito en el presente documento.

En una realización, un cáncer descrito en este documento es positivo para CLDN6. En una realización, las células cancerosas de un cáncer descrito en el presente documento son positivas para CLDN6. En una realización, las células cancerosas de un cáncer descrito en este documento expresan CLDN6 en su superficie celular.

En una realización, un cáncer descrito en el presente documento comprende cáncer primario, cáncer avanzado, cáncer metastásico, cáncer recurrente o una combinación de los mismos, tal como una combinación de cáncer primario y cáncer metastásico. En una realización, el cáncer es parcial o completamente refractario a la quimioterapia tal como la monoterapia con paclitaxel. En una realización, el cáncer es cáncer de ovario, en particular cáncer de ovario parcial o completamente refractario a la quimioterapia, tal como monoterapia con paclitaxel.

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

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El ARNm de *CLDN6* se expresa en células iPS humanas.
 Los fibroblastos de prepucio humano (HFF) se transfectaron usando Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) sin ARN (sin control de ARN) o con un cóctel de reprogramación (OSKMNL + EBK + mezcla de miR sin modificar) y las células se recogieron los días 5, 12 y 19 después del tratamiento. El ARN se extrajo, se transcribió en ADNc y luego se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando un sistema y software de detección de secuencia ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems con el kit QuantiTect SYBR green (Qiagen)). Se muestra la inducción doble de la expresión de *CLDN6* de células tratadas con el cóctel de reprogramación (barras negras) en relación con las células HFF desde el día 1 de tratamiento (barras grises). La expresión del ARNm de *CLDN6* se normalizó a la expresión de ARNm del gen de mantenimiento *HPRT1*. OSKMNL = factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG

y LIN28, EBK = proteínas de escape de IFN E3, K3 y B18R, mezcla de miR = miARN-302a/b/c/d y 367.

Figura 2: CLDN6 se expresa en la superficie de las células iPS humanas.

Las células HFF se transfectaron sin ARN (sin control de ARN) o con un cóctel de reprogramación (OSKMNL + EBK + mezcla de miR sin modificar) y las células se recogieron el día 5 (A), 12 (B) y 19 (C) después del tratamiento. Las células se tiñeron con 1 µg/mL de anticuerpo IMAB027-AF647 y SSEA- 4-V450 específico de CLDN6 (2,5 µL por prueba, adquirido a través de BD) durante 30 minutos a 4 °C y se analizó la expresión superficial por citometría de flujo. El experimento se realizó por duplicado y se muestran gráficos de puntos representativos. OSKMNL = factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG y LIN28, EBK = proteínas de escape de IFN E3, K3 y B18R, mezcla de miR = miARN-302a/b/c/d y 367.

Figura 3: Expresión superficial de CLDN6 en líneas celulares de cáncer de ovario.

Para analizar la expresión de CLDN6, las células 1E6 se tiñeron con 1 µg/mL de IMAB027-AF647 durante 30 minutos a 4 °C y se analizó la expresión superficial por citometría de flujo. En (A) se muestran las células COV318. Los experimentos se realizaron por triplicado y se presenta un gráfico de puntos representativos. En (B) se muestran células PA-1 transfectadas de forma estable con un vector de control (PA-1 76) o con un vector que expresa ARNph contra CLDN6 (clones PA-1 50 y PA-1 54). Los experimentos se realizaron por triplicado y se presenta un gráfico de puntos representativos. ARNph = ARN pequeño de horquilla.

Figura 4: CLDN6 es importante para la formación de colonias de células de cáncer de ovario.

Para analizar el comportamiento clonogénico, las células COV318, PA-1 50 y PA-1 54 se tiñeron con 1 µg/mL de IMAB027-AF647 durante 30 minutos a 4 °C y luego se clasificaron 700 (COV318) o 500 (PA-1 50/54) células positivas para CLDN6 o negativas para CLDN6 en placas de 6 pozos. Se permitió que las células formaran colonias durante 14 días y luego se tiñeron con cristal violeta al 0,5% durante 20 min. (A) Se muestra una imagen representativa para cada línea celular. (B) La cuantificación de las colonias se realizó contando manualmente. Se muestra la desviación media y estándar de tres experimentos independientes.

Figura 5: CLDN6 se coexpresa con los marcadores de CSC CD24, CD90 y CD44 en la línea celular de cáncer de ovario COV318.

Las células 1E6 COV318 se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos contra los diferentes marcadores de superficie de acuerdo con el panel de FACS que se muestra en la Tabla 1 y la expresión del marcador de CSC se analizó por citometría de flujo. Los experimentos fueron realizados por triplicado. En (A) se muestran gráficos representativos de puntos de colocalización de CLDN6 con diferentes marcadores de CSC establecidos. En (B) se calcularon porcentajes de colocalización de células positivas para CD44, CD24, CD90 y CLDN6 usando diferentes estrategias de activación indicadas en el eje x del diagrama. Se muestran los valores medios de triplicados y la desviación estándar.

Figura 6: El enriquecimiento de las células que expresan CLDN6 conduce a una acumulación de marcadores de CSC establecidos.

Las células COV318 se tiñeron con 0,5 µg/mL de IMAB027 y el anticuerpo secundario IgG antihumano de cabra conjugado con APC secundario (1:300) y las fracciones positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6 se aislaron posteriormente mediante clasificación por FACS. Las células de ambas fracciones se expandieron durante 10 días. Las células 1E6 de cada fracción se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos contra los diferentes marcadores de superficie de acuerdo con el panel de FACS que se muestra en la Tabla 1. El experimento se realizó por triplicado. En (A) se muestran gráficos de puntos representativos de los niveles de expresión de los diferentes marcadores de CSC en la fracción positiva para CLDN6 y negativa para CLDN6, así como su colocalización con CLDN6. En (B), los porcentajes de los niveles de expresión del marcador de CSC se muestran como diagrama y se calcularon los factores de enriquecimiento (veces que se expresan) para los marcadores relevantes CD44, CD90 y CD24 comparando porcentajes de células positivas en la fracción positiva para CLDN6 y negativa para CLDN6.

Figura 7: Las líneas celulares que expresan alto CLDN6 muestran un enriquecimiento de marcadores de CSC en comparación con las células que expresan bajo CLDN6.

Las células 1E6 de las líneas celulares de cáncer de ovario con expresión alta de CLDN6 OV90 (A) y PA-1 (B) o las líneas celulares de carcinoma de testículo NEC-8 (C) y NEC-14 (D) se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con anticuerpos contra los diferentes marcadores de superficie de acuerdo con el panel de FACS que se muestra en la Tabla 1 y la expresión del marcador de CSC se analizó por citometría de flujo. Los experimentos se realizaron por triplicado y se muestran gráficos de puntos representativos.

Figura 8: Efecto antitumoral de IMAB027 en combinación con paclitaxel en un modelo de tumor de xenoinjerto temprano.

Los tumores de xenoinjerto humano subcutáneo ES-2 que expresan ectópicamente CLDN6 humano se trataron con 15 mg/kg de paclitaxel en los días 3, 10 y 17 después del injerto por inyecciones ip. La terapia de mantenimiento con anticuerpos comenzó el día 4 con tres inyecciones de IMAB027 de 35 mg/kg por semana (alternando iv/ip/ip). (A) Cinética media del crecimiento tumoral (± SEM) después del tratamiento con IMAB027 (cuadrado blanco), paclitaxel (círculo gris), IMAB027 en combinación con paclitaxel (cuadrado negro) o el control de vehículo (círculo blanco). La flecha marca el momento de inicio de la terapia. (B) Curvas de supervivencia de ratones tratados. Tamaño del grupo:

n = 12.

Figura 9: Efecto antitumoral de IMAB027 en combinación con cisplatino en un modelo avanzado de tumor de xenoinjerto.

5 Los tumores de xenoinjerto NEC14 humano subcutáneo se cultivaron hasta un tamaño medio de $\sim 100 \text{ mm}^3$ antes del comienzo del tratamiento. Los ratones fueron tratados con 1 mg/kg de cisplatino mediante inyecciones ip diarias del día 6 al 10 después del injerto y con tres inyecciones de IMAB027 de 35 mg/kg por semana (alternando iv/ip/ip) comenzando el día 6 como terapia de mantenimiento. (A) Cinética media de crecimiento tumoral (\pm SEM) después del tratamiento con IMAB027 (círculo relleno), cisplatino (cuadrado sin relleno), IMAB027 en combinación con cisplatino (cuadrado relleno) o el control de vehículo (círculo sin relleno). La flecha marca el momento de inicio de la terapia. (B) Tamaño tumoral individual en ratones el día 24 después del injerto (media con \pm desviación estándar). (C) Curvas de supervivencia de ratones tratados. Tamaño del grupo: n = 19. Valores P: *, p <0,05; **, p <0,01 y ***, p <0,001.

Figura 10: Efecto antitumoral de IMAB027 en combinación con carboplatino en un modelo de tumor de xenoinjerto avanzado.

15 Los tumores de xenoinjerto NEC 14 humano avanzado se trataron con IMAB027 solo o en combinación con un fármaco citostático como se describe en la Figura 9. En lugar de cisplatino, los ratones fueron tratados con 30 mg/kg de carboplatino en los días 6, 13 y 20 mediante inyecciones ip de bolo (A) Cinética media de crecimiento tumoral (\pm SEM) después del tratamiento con IMAB027 (círculo relleno), carboplatino (cuadrado sin relleno), IMAB027 en combinación con carboplatino (cuadrado relleno) o el control de vehículo (círculo sin relleno). La flecha marca el momento de inicio de la terapia. (B) Tamaño tumoral individual en ratones el día 24 después del injerto (media con \pm desviación estándar). (C) Curvas de supervivencia de ratones tratados. Tamaño del grupo: n = 19. Valores P: *, p <0,05; **, p <0,01 y ***, p <0,001.

Figura 11: CLDN6 es importante para el comportamiento de formación de esferas de las células de cáncer de ovario. Para analizar el impacto de CLDN6 en la formación de esferas, se aislaron células CODN3 positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6 mediante clasificación celular activada por fluorescencia después de la tinción con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IMAB027. Se cultivaron células CODN3 positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6 en placas de fijación ultrabajas en condiciones de formación de esferas (medio DMEM/F12 sin suero que contenía albúmina de suero bovino al 0,4%, 20 ng/mL del factor básico de crecimiento de fibroblastos, 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina). (A) Imágenes representativas de esferas de primera generación de células CODN3 positivas para CLDN6 (CLDN6+) y negativas para CLDN6 (CLDN6-) en los días 3, 8 y 19 posteriores a la clasificación. (B) Imágenes representativas de esferas de segunda generación obtenidas de células individuales de esferas de primera generación CLDN6+ de (A) en el día 22 posterior a la clasificación.

Figura 12: Enriquecimiento de células positivas para CLDN6 después del tratamiento con derivados de platino. Las células COV318 se trataron con 500 ng/mL de cisplatino o 2.000 ng/mL de carboplatino durante 4 días. Después del tratamiento, las células se cultivaron en ausencia de fármacos citostáticos durante 3 días adicionales (barras blancas) y 6 días (barras negras), respectivamente. La expresión de CLDN6 se analizó mediante citometría de flujo usando el anticuerpo IMAB027 específico de CLDN6 y un anticuerpo de control de isotipo. La expresión de las células COV318 tratadas se muestra en relación con las células no tratadas. Para la evaluación, los valores del control de isotipo se sustrajeron de la tinción de CLDN6.

Figura 13: Enriquecimiento de células positivas para CLDN6 después del injerto intraperitoneal. Se inyectaron células COV318 por vía intraperitoneal en ratones atímicos desnudos. Los ratones que desarrollaron ascitis se sacrificaron, y se recogieron tanto ascitis como tumores sólidos para una caracterización adicional. Las células aisladas se analizaron para la expresión de CLDN6 inmediatamente después de la preparación y después de que se mantuvieron en cultivo durante varios pasadas. (A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CLDN6 en células COV318 parentales usando el anticuerpo IMAB027 específico de CLDN6 y un control de isotipo. (B) Expresión de CLDN6 en células derivadas de ascitis y tumores sólidos de ovario, hígado, estómago, páncreas y diafragma en diferentes puntos de tiempo después del aislamiento (*: ascitis en los días 5 y 35; **: tumores sólidos en los días 12 y 29). La intensidad de fluorescencia se muestra en el eje X. El recuento de eventos que se muestra en el eje Y se escala como un porcentaje del recuento máximo de eventos.

Figura 14: CLDN6 se correlaciona con marcadores de células madre de cáncer de ovario en muestras de tumores primarios.

Se analizaron 42 muestras de cáncer de ovario para determinar sus niveles de expresión de ARNm de CLDN6 y una variedad de marcadores de células madre de cáncer de ovario descritos por qRT-PCR usando un sistema de detección y software Fluidigm. El análisis de correlación de Spearman se realizó para analizar la correlación de CLDN6 con los marcadores específicos de células madre cancerosas. En (A) se muestran gráficos de dispersión de correlaciones significativas (valores P \leq 0,05). En (B) se muestra un resumen de todas las correlaciones.

Figura 15: ADCC mediada por IMAB027 después del tratamiento con carboplatino y paclitaxel. La actividad ADCC de IMAB027 en combinación con quimioterapia se analizó utilizando células objetivo COV362 (Luc). Por lo tanto, las células fueron tratadas durante 4 días con carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, doxorubicina o topotecano a las concentraciones indicadas. Después del tratamiento, las células se cultivaron durante 3 (A-D) y 10 días (E-J) en

ausencia de fármacos citostáticos, respectivamente. Las células de control se cultivaron sin citostáticos. (A, C, E, G, I). Los experimentos de ADCC se realizaron con IMAB027 (líneas negras) o un anticuerpo de control de isotipo (líneas grises) usando PBMC de donantes sanos en una relación de células efectoras (PBMC) a objetivo de -40:1. Los puntos de datos (n = 4 réplicas) se representan como la media \pm DE. (B, D, F, H, J) La expresión de CLDN6 se analizó por citometría de flujo usando IMAB027. Las líneas de puntos negros demuestran la expresión de CLDN6 en células no tratadas, los histogramas rellenos de gris representan la expresión de CLDN6 después del tratamiento.

Figura 16: Efecto antitumoral de IMAB027 en combinación con el tratamiento con PEB en un modelo de tumor de xenoinjerto muy avanzado.

Los tumores de xenoinjerto NEC14 humano subcutáneo se cultivaron en ratones desnudos hasta una etapa muy avanzada. La terapia tumoral con PEB (cisplatino, etopósido y bleomicina) e IMAB027 comenzó el día 13. Los ratones que recibieron el régimen de PEB fueron tratados con 1 mg/kg de cisplatino y 5 mg/kg de etopósido los días 13, 14, 15, 16 y 17 y con 10 mg/kg de bleomicina los días 13, 17 y 21 mediante inyecciones ip. El anticuerpo IMAB027 se administró tres veces por semana alternando inyecciones iv/ip/ip de 35 mg/kg desde el día 13 hasta el 101 después del injerto. Los grupos de control de vehículos recibieron solución de NaCl al 0,9% y tampón de sustancia farmacológica. Los ratones fueron monitoreados durante 220 días en total. (A), (B) Cinética media de crecimiento tumoral (\pm SEM) de ratones no tratados y ratones tratados con IMAB027, PEB o PEB en combinación con IMAB027. La flecha marca el punto de inicio del tratamiento (prueba de comparación múltiple de Dunn: ***, p <0,001). (C) Curvas de supervivencia de ratones no tratados y ratones tratados con IMAB027, PEB o PEB en combinación con IMAB027 (prueba de Mantel-Cox: *, p <0,05; **, p <0,01). Tamaño del grupo: n = 14.

Figura 17: Afinidad de unión relativa y citotoxicidad de IMAB027, IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE.

(A) La unión de IMAB027, IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE se midió mediante análisis de citometría de flujo en células OV90 que expresan CLDN6 endógenamente. (B) Curvas de dosis-respuesta de reducción mediada por IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE de la viabilidad de las células OV90. Las células tumorales se incubaron durante 72 h con IMAB027-DM1 o IMAB027-vcMMAE. La reducción de la viabilidad celular se midió usando un ensayo de viabilidad basado en XTT. Los puntos de datos (n = 3 repeticiones) se representan como la media \pm DE. MFI: intensidad de fluorescencia media.

Figura 18: Efecto antitumoral de los conjugados IMAB027-DM1 en tumores de xenoinjerto avanzados.

Los ratones desnudos con tumores de xenoinjerto OV90 humanos subcutáneos establecidos se trataron 10 días después del injerto con inyecciones intravenosas de dosis única de 1,78, 5,33 o 16 mg/kg de IMAB027-DM1 o control de vehículo. El tamaño de los tumores subcutáneos se midió dos veces por semana (media + SEM). Tamaño del grupo: n = 5, *: p <0,05, **: p <0,01.

Figura 19: Hallazgo del intervalo de dosis de conjugados de IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE en tumores de xenoinjerto OV90 avanzados.

Los ratones desnudos con tumores de xenoinjerto OV90 humanos subcutáneos establecidos se trataron 10 días después del injerto con una inyección intravenosa de dosis única de IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE, vehículo o inyecciones de dosis repetidas de IMAB027. (A) Crecimiento tumoral de ratones tratados con 1,33; 2,67 o 5,33 mg/kg de IMAB027-DM1 iv (arriba) o con 4, 8 o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE iv (abajo) en comparación con el control de vehículo e IMAB027 (35 mg/kg, semanal iv/ip/ip). El tamaño de los tumores subcutáneos se midió dos veces por semana (media + SEM). (B) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tratados con vehículo o 4, 8 o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1400 mm³ o si los tumores se volvieron ulcerosos. Tamaño del grupo: n = 10, *: p <0,05, **: p <0,01, ***: p <0,001.

Figura 20: Hallazgo del intervalo de dosis de conjugados IMAB027-vcMMAE en tumores de xenoinjerto de PA-1 avanzados.

Los ratones desnudos con tumores de xenoinjerto de PA-1 humanos subcutáneos establecidos se trataron 15 días después del injerto con una inyección intravenosa de dosis única de IMAB027-vcMMAE, control de vehículo o inyecciones de dosis repetidas de IMAB027. (A) Crecimiento tumoral medio (\pm SEM) y (B) curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones tratados con control de vehículo, IMAB027 (35 mg/kg, semanalmente iv/ip/ip) o 4, 8 o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1400 mm³ o si los tumores se volvieron ulcerosos. Tamaño del grupo: n = 8, *: p <0,05, **: p <0,01. (C) Tinción inmunohistoquímica representativa contra CLDN6 en secciones de tumor de xenoinjerto de PA-1 en diferentes puntos de tiempo después del injerto.

Figura 21: Efecto antitumoral de IMAB027-vcMMAE en tumores de xenoinjerto MKN74 avanzados.

Los ratones desnudos con tumores de xenoinjerto MKN74 humanos subcutáneos establecidos se trataron 7 días después del injerto con una inyección intravenosa de 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE o control de vehículo. (A) Crecimiento tumoral medio (\pm SEM) y (B) curvas de supervivencia Kaplan-Meier de ratones tratados con control de vehículo o IMAB027-vcMMAE. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1400 mm³ o si los tumores se volvieron ulcerosos. Tamaño del grupo: n = 10. (C) Análisis de citometría de flujo de la expresión de CLDN6 en el injerto previo de células tumorales MKN74 y tinción inmunohistoquímica representativa de un tumor de xenoinjerto MKN74 no tratado en el día 31 después del injerto. **: p <0,01, ***: p <0,001.

Figura 22: Efecto antitumoral de IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE en tumores de ovario humanos metastásicos intraperitoneales avanzados.

Los ratones desnudos se injertaron intraperitonealmente con la línea celular de carcinoma de ovario humano PA-1 (Luc) que expresa ectópicamente luciferasa. Después de la formación de tumores de xenoinjerto metastásico intraperitoneal, los animales fueron tratados con 16 mg/kg de IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE o control de vehículo mediante inyección ip el día 14 después del injerto. El crecimiento de metástasis se determinó después de la administración de luciferina por actividad de luminiscencia usando un sistema de formación de imágenes IVIS Lumina. (A) Cuantificación de la carga de metástasis de ratones tratados con IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE o vehículo. (B) Imágenes de luminiscencia del cuerpo entero *in vivo* de ratones desnudos el día 28 después del injerto. Tamaño del grupo: n = 8 (vehículo) on = 9 (IMAB027-DM1, IMAB027-vcMMAE), **: p < 0,01, ****: p < 0,0001.

Figura 23: Endocitosis de anticuerpos unidos a CLDN6 por células de carcinoma humano.

La endocitosis de IMAB027 unido a CLDN6, chimAB5F2D2 o anticuerpos de control de isotipo se determinó usando un ensayo basado en citotoxicidad que depende de la cointernalización de los anticuerpos unidos al objetivo y un fragmento Fab de IgG anti-humano conjugado con saporina (FabZap). Las células de carcinoma humano PA-1, OV90 o NEC14 se incubaron durante 72 h con IMAB027, chimAB5F2D2 o un anticuerpo de control de isotipo y el FabZap antihumano. (A) Curvas dosis-respuesta de reducción mediada por IMAB027/FabZap y chimAB5F2D2/FabZap de la viabilidad de células PA-1, OV90 y NEC14, respectivamente. Los puntos de datos (n = 3 repeticiones) se representan como la media ± DE. (B) Comparación EC50 normalizada para IMAB027 (EC50 relativa) y máxima (máxima relativa) de unión citométrica de flujo y endocitosis.

Descripción detallada de la invención

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

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención.

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

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

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

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria descriptiva.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, en las que establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembrana que atraviesan la membrana 4 veces con el extremo

terminal N y el extremo terminal C ambos ubicados en el citoplasma. El primer bucle extracelular, denominado EC1 o ECL1, consta de un promedio de 53 aminoácidos, y el segundo bucle extracelular, denominado EC2 o ECL2, consta de alrededor de 24 aminoácidos. Las proteínas de la superficie celular de la familia claudina, tales como CLDN6, se expresan en tumores de diversos orígenes, y son particularmente adecuadas como estructuras objetivo en relación con la inmunoterapia contra el cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal relevante para la toxicidad) y localización en la membrana plasmática.

Se ha identificado CLDN6 como expresado diferencialmente en tejidos tumorales, siendo la placenta el único tejido normal que expresa CLDN6 en el que se detectan bajas cantidades de CLDN6 a nivel de ARN. Se ha encontrado que CLDN6 se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanomas, cáncer de cabeza y cuello, sarcomas, cáncer de conductos biliares, cáncer de células renales y cáncer de vejiga urinaria.

En diversas realizaciones de la invención, las enfermedades cancerosas asociadas con la expresión de CLDN6 incluyen cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario y teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma y adenocarcinoma de pulmón de células escamosas, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, en particular carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en particular sarcoma y carcinosarcoma sinovial, cáncer de conductos biliares, cáncer de vejiga urinaria, en particular carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales que incluye carcinoma de células renales de células claras y carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, incluido el cáncer de íleon, en particular adenocarcinoma de intestino delgado y adenocarcinoma de íleon, carcinoma embrionario testicular, coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer testicular, en particular seminoma testicular, teratoma testicular y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino, tumores de células germinales tales como un teratocarcinoma o un carcinoma embrionario, en particular tumores de células germinales de los testículos y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad cancerosa asociada con la expresión de CLDN6 se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de ovario metastásico y cáncer de pulmón metastásico. Preferiblemente, el cáncer de ovario es un carcinoma o un adenocarcinoma. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma o un adenocarcinoma, y preferiblemente es un cáncer bronquiolar tal como un carcinoma bronquiolar o un adenocarcinoma bronquiolar.

El término "CLDN" como se usa en el presente documento significa claudina e incluye CLDN6. Preferiblemente, una claudina es una claudina humana.

El término "CLDN6" se refiere preferiblemente a CLDN6 humana, y, en particular, a una proteína que comprende, preferiblemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. El primer bucle extracelular de CLDN6 comprende preferiblemente los aminoácidos 28 a 80, más preferiblemente los aminoácidos 28 a 76 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. El segundo bucle extracelular de CLDN6 comprende preferiblemente los aminoácidos 138 a 160, preferiblemente los aminoácidos 141 a 159, más preferiblemente los aminoácidos 145 a 157 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2. Dicho primero y segundo bucles extracelulares forman preferiblemente la porción extracelular de CLDN6.

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

De acuerdo con la invención, el término "cáncer positivo para claudina" o términos similares significa un cáncer que implica células cancerosas que expresan una claudina, preferiblemente en la superficie de dichas células cancerosas. CLDN6 se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por anticuerpos específicos de CLDN6 añadidos a las células.

La "superficie celular" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que es accesible para la unión por proteínas y otras moléculas. Por ejemplo, una proteína transmembrana que tiene una o más porciones extracelulares se considera expresada en la superficie celular.

El término "porción extracelular" en el contexto de la presente invención se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que se enfrenta al espacio extracelular de una célula y preferiblemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por moléculas de unión a antígeno tales como anticuerpos ubicados fuera de la célula. Preferiblemente, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o un fragmento de los

mismos.

Los términos "parte" o "fragmento" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura comprende preferiblemente una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción, una parte o un fragmento de un epítipo o péptido es preferiblemente inmunológicamente equivalente al epítipo o péptido del que deriva. Una parte o fragmento de una secuencia de proteína comprende preferiblemente una secuencia de al menos 6, en particular al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia de proteínas.

De acuerdo con la invención, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión es más bajo en comparación con la expresión en células de placenta o tejido de placenta. Preferiblemente, el nivel de expresión es inferior al 10%, preferiblemente inferior al 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o 0,05% de la expresión en células de placenta o tejido de placenta o incluso inferior. Preferiblemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en tejido no canceroso que no sea placenta en no más de 2 veces, preferiblemente 1,5 veces, y preferiblemente no excede el nivel de expresión en dicho tejido no canceroso. Preferiblemente, CLDN6 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN6 añadidos a las células.

De acuerdo con la invención, CLDN6 se expresa en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto de la placenta, preferiblemente en más de 2 veces, preferiblemente 10 veces, 100 veces, 1.000 veces o 10.000 veces. Preferiblemente, CLDN6 se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto como para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN6 añadidos a las células. Preferiblemente, CLDN6 expresada en una célula se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

Se ha encontrado que la expresión de CLDN6 solo es detectable en la placenta como ARNm, mientras que ninguna proteína es detectable en absoluto. Por lo tanto, las declaraciones hechas en el presente documento con respecto a la expresión de CLDN6 en placenta preferiblemente se refieren a la expresión de ARNm.

De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluido el cáncer, en particular las formas de cáncer descritas en el presente documento. Cualquier referencia en el presente documento al cáncer o formas particulares de cáncer también incluye metástasis de cáncer del mismo. En una realización preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud implica células que expresan CLDN6, en particular células madre cancerosas que expresan CLDN6.

"Enfermedades asociadas con células que expresan CLDN6" o expresiones similares significa de acuerdo con la invención que CLDN6 se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. En una realización, la expresión de CLDN6 en células de un tejido u órgano enfermo aumenta en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos 10%, en particular al menos 20%, al menos 50%, al menos 100%, al menos 200%, al menos 500%, al menos 1.000%, al menos 10.000% o incluso más. En una realización, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano correspondiente se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades asociadas con las células que expresan CLDN6 incluyen enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades cancerosas son preferiblemente aquellas en las que las células cancerosas expresan CLDN6.

Como se usa en el presente documento, una "enfermedad cancerosa" o "cáncer" incluye una enfermedad caracterizada por un crecimiento celular regulado aberrantemente, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración. Por "célula cancerosa" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Preferiblemente, una "enfermedad cancerosa" se caracteriza por células que expresan CLDN6, en particular células madre cancerosas que expresan CLDN6.

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

De acuerdo con la invención, un "carcinoma" es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo

representa los cánceres más comunes, incluidas las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

El "adenocarcinoma" es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido también forma parte de una categoría de tejido más grande conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye piel, glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio se deriva embriológicamente del ectodermo, el endodermo y el mesodermo. Para ser clasificadas como adenocarcinoma, las células no necesariamente deben ser parte de una glándula, siempre que tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede ocurrir en algunos mamíferos superiores, incluidos los humanos. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que derivan, mientras que los mal diferenciados pueden no serlo. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza ubicua de las glándulas dentro del cuerpo. Si bien es posible que cada glándula no esté secretando la misma sustancia, siempre que haya una función exocrina en la célula, se considera glandular y, por lo tanto, su forma maligna se denomina adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos y a menudo hacen metástasis con el tiempo suficiente para hacerlo. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas serosos y mucinosos, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometrioide.

Por "metástasis" se entiende la propagación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportados por la sangre, infiltración de órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema regional de ganglios linfáticos. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a metástasis de ganglios linfáticos.

Un cáncer refractario es una neoplasia maligna para la que un tratamiento particular es ineficaz, que inicialmente no responde al tratamiento o que no responde con el tiempo. Los términos "refractario", "no responde" o "resistente" se usan indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "célula madre cancerosa" se refiere a una célula que puede ser un progenitor de una célula cancerosa altamente proliferativa. Una célula madre cancerosa tiene la capacidad de volver a crecer un tumor como lo demuestra su capacidad de formar tumores en ratones inmunocomprometidos. Las células madre cancerosas también suelen crecer lentamente en relación con la mayor parte de un tumor, es decir, las células madre cancerosas generalmente están inactivas. En ciertas realizaciones, pero no en todas, la célula madre cancerosa puede representar solo una parte, tal como aproximadamente del 0,1 al 10% de un tumor. Las células madre cancerosas pueden tener una o más o todas las siguientes características o propiedades: (i) puede albergar la capacidad de iniciar un tumor y/o perpetuar el crecimiento tumoral, (ii) generalmente pueden estar relativamente menos mutadas que el grueso de un tumor (por ejemplo, debido a un crecimiento más lento y, por lo tanto, menos errores dependientes de la replicación del ADN, reparación mejorada del ADN y/o cambios epigenéticos/no mutagénicos que contribuyen a su malignidad), (iii) puede tener muchas características de (a) células madre normales (por ejemplo, un perfil similar de antígeno de superficie celular y/o expresión intracelular, programas de autorrenovación, resistencia a múltiples fármacos, un fenotipo inmaduro, etc., característico de células madre normales) y puede derivarse de (a) células madre normales, (iv) pueden ser la fuente de metástasis, (v) pueden ser de crecimiento lento o inactivas, (vi) pueden ser tumorigénicas (por ejemplo, de acuerdo con lo determinado por los experimentos de implantación de NOD/SCID), (vii) pueden ser relativamente resistentes a las terapias tradicionales (es decir, quimiorresistente) y (viii) pueden comprender una subpoblación de un tumor (por ejemplo, relativo a la masa tumoral).

Por "tratar" se entiende administrar un tratamiento tal como un compuesto o composición o una combinación de compuestos o composiciones a un sujeto para prevenir o eliminar una enfermedad, incluida la reducción del tamaño de un tumor o el número de tumores en un sujeto, detener o retrasar una enfermedad en un sujeto, inhibir o retrasar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o recurrencias en un sujeto que actualmente tiene o que ha tenido una enfermedad anteriormente y/o prolongar, es decir, aumentar o ampliar la vida útil del sujeto. En particular, el término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o empeoramiento, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

En el contexto de la presente invención, términos tales como "proteger" o "prevenir" se relacionan con la prevención o el tratamiento o la ocurrencia y/o propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, para minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o de retrasar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de cáncer sería un candidato para la terapia para prevenir el cáncer.

Por "estar en riesgo" se entiende un sujeto que se identifica que tiene una probabilidad mayor de lo normal de

desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha tenido, o que tiene actualmente, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que dicho sujeto puede continuar desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen, o que han tenido, un cáncer también tienen un mayor riesgo de metástasis de cáncer.

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

Como se usa en el presente documento, el término "combinación" en el contexto de la administración de una terapia se refiere al uso de más de una terapia o agente terapéutico. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en que las terapias o agentes terapéuticos se administran a un sujeto. Se puede administrar una terapia o agente terapéutico antes, de forma concomitante o posterior a la administración de una segunda terapia o agente terapéutico a un sujeto. Preferiblemente, las terapias o agentes terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia, cantidad y/o dentro de un intervalo de tiempo tal que las terapias o agentes terapéuticos puedan actuar juntos. En una realización particular, las terapias o agentes terapéuticos se administran a un sujeto en una secuencia, cantidad y/o dentro de un intervalo de tiempo tal que proporcionan un beneficio mayor que si se administraran de otra manera, en particular, independientemente uno del otro. Preferiblemente, el beneficio incrementado es un efecto sinérgico.

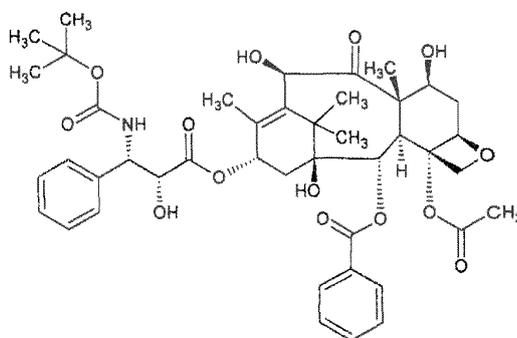
"Célula objetivo" significará cualquier célula indeseable tal como una célula cancerosa, en particular una célula madre cancerosa. En realizaciones preferidas, la célula objetivo expresa CLDN6.

De acuerdo con la invención, el término "quimioterapia" se refiere al tratamiento con uno o más agentes quimioterapéuticos o combinaciones de agentes quimioterapéuticos tales como agentes citostáticos o agentes citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos de acuerdo con la invención incluyen compuestos citostáticos y compuestos citotóxicos.

De acuerdo con la invención, el término "agente quimioterapéutico" incluye taxanos tales como paclitaxel y docetaxel y compuestos de platino tales como cisplatino y carboplatino, y combinaciones de los mismos. Las combinaciones preferidas, en particular para el tratamiento del cáncer de ovario, pueden comprender una combinación de un taxano y un compuesto de platino tal como una combinación de paclitaxel y carboplatino. Otras combinaciones preferidas, en particular para el tratamiento del cáncer de ovario, en particular tumores de células germinales de ovario, y/o para el tratamiento de tumores de células germinales, en particular tumores de células germinales de ovario y testicular, pueden comprender una combinación de un compuesto de platino tal como cisplatino con etopósido y/o bleomicina. De acuerdo con la invención, una referencia a un agente quimioterapéutico es incluir cualquier profármaco tal como éster, sal o derivado tal como conjugado de dicho agente. Los ejemplos son conjugados de dicho agente con una sustancia portadora, por ejemplo, paclitaxel unido a proteínas tal como paclitaxel unido a albúmina. Preferiblemente, las sales de dicho agente son farmacéuticamente aceptables.

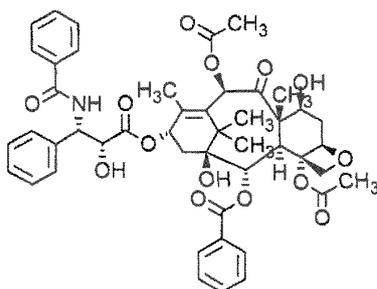
Los taxanos son una clase de compuestos de diterpeno que se derivaron primero de fuentes naturales tales como plantas del género *Taxus*, pero algunos se han sintetizado artificialmente. El principal mecanismo de acción de la clase de fármacos de los taxanos es la interrupción de la función de los microtúbulos,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

El término "docetaxel" se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término "docetaxel" se refiere al compuesto 1,7 β , 10 β -trihidroxi-9-oxo-5 β , 20-epoxitax-11-eno-2 α , 4,13 α -triiil 4-acetato 2-benzoato 13-((2R, 3S)-3-[(terc-butoxicarbonil)-amino]-2-hidroxi-3-fenilpropanoato).

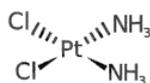
De acuerdo con la invención, el término "paclitaxel" se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



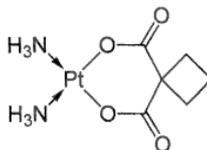
En particular, el término "paclitaxel" se refiere al compuesto (2 α , 4 α , 5 β , 7 β , 10 β , 13 α)-4,10-bis-(acetiloxi)-13-[[[(2R, 3S)-3-(benzoilamino)-2-hidroxi-3-fenilpropanoil]oxil-1,7-dihidroxi-9-oxo-5,20-epoxitax-11-en-2-il benzoato.

5 El término "compuesto de platino" se refiere a compuestos que contienen platino en su estructura tal como complejos de platino e incluye compuestos tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

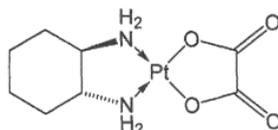
10 El término "cisplatino" se refiere al compuesto cis-diaminodicloroplatino (II) (CDDP) de la siguiente fórmula:



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



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

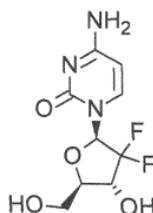


25 En particular, el término "oxaliplatino" se refiere al compuesto [(1R, 2R)-ciclohexano-1,2-diamina] (etanodioato-O, O') platino (II). Oxaliplatino para inyección también se comercializa con el nombre comercial Eloxatina.

Los agentes quimioterapéuticos adicionales que están previstos para su uso en la presente invención, ya sea solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos tales como taxanos o compuestos de platino, incluyen, pero sin limitación, análogos de nucleósidos, análogos de camptotecina y antraciclinas.

30 El término "análogo de nucleósido" se refiere a un análogo estructural de un nucleósido, una categoría que incluye tanto análogos de purina como análogos de pirimidina.

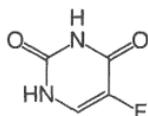
El término "gemcitabina" es un compuesto que es un análogo de nucleósido de la siguiente fórmula:



35 En particular, el término se refiere al compuesto 4-amino-1-(2-desoxi-2,2-difluoro- β -D-eritro-pentofuranosil)pirimidin-2 (1H)-ona o 4-amino-1-[(2R, 4R, 5R)-3,3-difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-1,2-dihidropirimidin-2-ona.

40 El término "análogo de nucleósido" incluye derivados de fluoropirimidina tales como fluorouracilo y profármacos de los

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

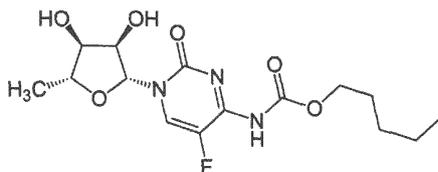


5

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

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

10

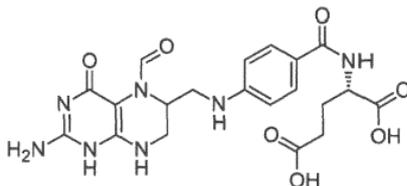


En particular, el término se refiere al compuesto pentil [1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofurano-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbamato.

15

El término "ácido folínico" o "leucovorina" se refiere a un compuesto útil en combinación sinérgica con el agente quimioterapéutico 5-fluorouracilo. Por lo tanto, si se hace referencia en el presente documento a la administración de 5-fluorouracilo o un profármaco del mismo, dicha administración en una realización puede comprender una administración junto con ácido folínico. El ácido folínico tiene la siguiente fórmula:

20

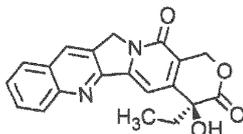


En particular, el término se refiere al compuesto Ácido (2S)-2-[[4-[(2-amino-5-formil-4-oxo-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoil]amino}pentanodioico.

25

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

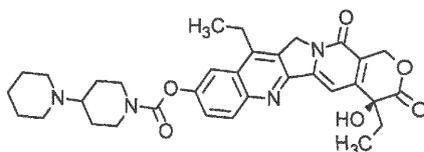
30



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

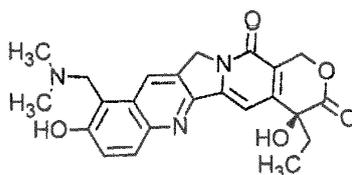
El irinotecano es un fármaco que evita que el ADN se desenrolle por inhibición de la topoisomerasa I. En términos químicos, es un análogo semisintético del alcaloide camptotecina natural que tiene la siguiente fórmula:

40



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

Topotecano es un inhibidor de topoisomerasa de la fórmula:



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

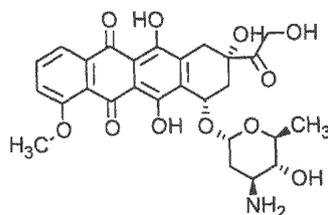
5 Las antraciclinas son una clase de fármacos comúnmente utilizados en la quimioterapia contra el cáncer que también son antibióticos. Estructuralmente, todas las antraciclinas comparten una estructura común de cuatro anillos de 7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-quinona y generalmente requieren glicosilación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

10 Las antraciclinas preferiblemente producen uno o más de los siguientes mecanismos de acción: 1. Inhibir la síntesis de ADN y ARN intercalando entre pares de bases de la cadena de ADN/ARN, evitando así la replicación de células cancerosas de rápido crecimiento. 2. Inhibir la enzima topoisomerasa II, evitando la relajación del ADN superenrollado y bloqueando así la transcripción y replicación del ADN. 3. Crear radicales libres de oxígeno mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares.

15 El término "antraciclina" se refiere preferiblemente a un agente, preferiblemente un agente anticancerígeno para inducir apoptosis, preferiblemente inhibiendo la unión del ADN en la topoisomerasa II.

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

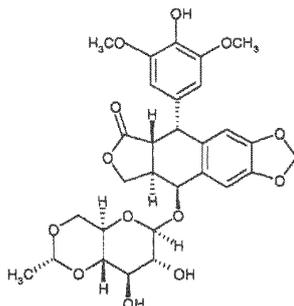
Específicamente contemplada como antraciclina en el contexto de la presente invención es la epirubicina. La epirubicina es un medicamento de antraciclina que tiene la siguiente fórmula:



30 y se comercializa con el nombre comercial Ellence en los Estados Unidos. y Farmorrubicina o Epirubicina Ebewe en otros lugares. En particular, el término "epirubicina" se refiere al compuesto (8R, 10S)-10-[(2S, 4S, 5R, 6S)-4-amino-5-hidroxi-6-metil-oxan-2-il]oxi-6,11-dihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-8-metil-9,10-dihidro-7H-tetraceno-5,12-diona.

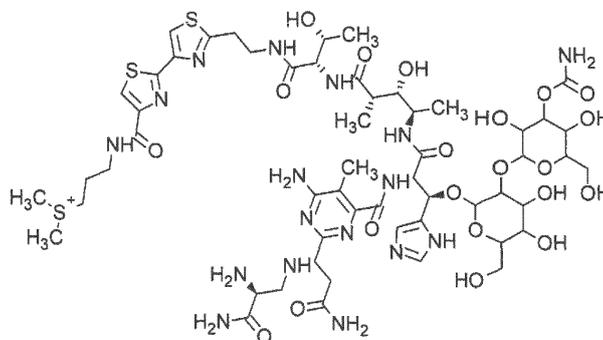
35 La epirubicina se ve favorecida sobre la doxorubicina, la antraciclina más popular, en algunos regímenes de quimioterapia, ya que parece causar menos efectos secundarios.

40 El término "etopósido" se refiere a un derivado semisintético de podofilotoxina que exhibe actividad antitumoral. El etopósido inhibe la síntesis de ADN formando un complejo con topoisomerasa II y ADN. Este complejo induce rompimientos en el ADN bicatenario y evita la reparación mediante la unión de topoisomerasa II. Los rompimientos acumulados en el ADN impiden la entrada en la fase mitótica de la división celular y conducen a la muerte celular. El etopósido tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término se refiere al compuesto 4'-desmetil-epipodofilotoxina 9-[4,6-O-(R)-etiliden-beta-D-glucopiranosido], 4'-(dihidrógeno fosfato).

- 5 El término "bleomicina" se refiere a un antibiótico glicopeptídico producido por la bacteria *Streptomyces verticillus*. Cuando se usa como agente anticancerígeno, funciona al provocar rupturas en el ADN. La bleomicina comprende preferiblemente un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



- 10 Si de acuerdo con la invención la quimioterapia se administra en combinación con un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 (que puede estar presente en un conjugado con al menos una fracción de fármaco de toxina, es decir, como un conjugado de fármaco con anticuerpo), se prefiere que la quimioterapia se administre antes y/o simultáneamente con la administración del anticuerpo (como una mezcla o como composiciones separadas).
 15 Preferiblemente, la administración de la quimioterapia se inicia antes de la administración del anticuerpo. Preferiblemente, la quimioterapia aumenta la expresión de CLDN6 en células cancerosas, tales como células madre cancerosas, y se inicia o administra antes de la administración del anticuerpo, de modo que se potencia la actividad antitumoral del anticuerpo. Preferiblemente, la administración de la quimioterapia comienza al menos 2, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12 o al menos 14 días antes de la primera administración del anticuerpo.
 20 La administración de quimioterapia puede continuar durante la administración del anticuerpo o puede detenerse antes o durante la administración del anticuerpo, tal como 1 a 3, 1 a 7, 1 a 10 o 1 a 14 días antes de la administración del anticuerpo. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico comprende un taxano tal como paclitaxel o docetaxel y/o un compuesto de platino tal como cisplatino o carboplatino.

- 25 El término "antígeno" se refiere a un agente tal como una proteína o péptido que comprende un epítipo contra el cual se dirige y/o se va a dirigir una respuesta inmune. En una realización preferida, un antígeno es un antígeno asociado a tumor, tal como CLDN6, es decir, un constituyente de células cancerosas que pueden derivarse del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, preferiblemente en gran cantidad, intracelular o como antígenos de superficie en células cancerosas.

- 30 En el contexto de la presente invención, el término "antígeno asociado a tumor" o "antígeno tumoral" se refiere preferiblemente a proteínas que están en condiciones normales expresadas específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tejidos tumorales o cancerosos. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia preferiblemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferiblemente no se expresa, o solo rara vez, en tejidos normales.
 35

- El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que es reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, que es reconocida por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítipos son los sitios tridimensionales discretos en un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmune. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítipo de una proteína tal como CLDN6 comprende preferiblemente una porción continua o discontinua de dicha proteína y
 40 preferiblemente está entre 5 y 100, preferiblemente entre 5 y 50, más preferiblemente entre 8 y 30, lo más preferiblemente entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener preferiblemente 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.
 45

- El término "anticuerpo" incluye una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, y cualquier molécula que comprenda una porción de unión a antígeno de dicha glicoproteína. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, fragmentos o derivados de anticuerpos, incluidos, entre otros, anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de scFv y de unión a antígeno tales como Fab y Fab' y también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo,
 50 anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento de anticuerpo y derivados
 55

de unión a antígeno como se describe en el presente documento. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino hasta el extremo terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

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

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

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

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

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

Los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen pero no se limitan a ratón, rata, conejo, cobaya y humano.

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

[0125] Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo

transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en el organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

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

10 Los anticuerpos descritos en el presente documento están preferiblemente aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN6 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN6) Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN6 humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de la especie CLDN6). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o compuestos químicos. Una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que tienen diferentes especificidades y que se combinan en una composición o mezcla bien definida.

20 Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; 25 (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. 30 Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar 35 incluidos dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH₃ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH₂. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se divulgan adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

45 El término "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente invención una estructura, por ejemplo, de un anticuerpo, que se une/interactúa con una estructura/antígeno/epítipo objetivo dado. Por lo tanto, el dominio de unión de acuerdo con la invención designa un "sitio de interacción con el antígeno".

50 Todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos tales como fragmentos de anticuerpos como se divulgan en el presente documento para los fines de la invención están abarcados por el término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo.

55 Los anticuerpos de origen natural son generalmente monoespecíficos, es decir, se unen a un único antígeno. Se divulgan los anticuerpos que se unen a una célula objetivo (mediante acoplamiento a CLDN6) y una segunda entidad, tal como una célula citotóxica (por ejemplo, mediante acoplamiento del receptor CD3). Los anticuerpos de la presente invención pueden ser biespecíficos o multiespecíficos tales como triespecíficos, tetraespecíficos, etc.

60 El término "molécula biespecífica" pretende incluir un agente que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de la superficie celular, y (b) un receptor tal como un receptor Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" pretende incluir un agente que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de la superficie celular, (b) un receptor tal como un receptor Fc en la superficie de una célula efectora y (c) al menos otro componente. En consecuencia, el término "anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6" 65 incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, triespecíficas, tetraespecíficas y otras moléculas multiespecíficas que se dirigen a CLDN6 y a otros objetivos, tales como los receptores Fc en las células efectoras. El término

"anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, et al., (1994) Structure 2: 1121-1123).

Un "anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6" preferiblemente es capaz de provocar funciones efectoras inmunes como se divulga en el presente documento. Preferiblemente, dichas funciones efectoras inmunes están dirigidas contra células tales como células madre cancerosas que portan el antígeno CLDN6 asociado al tumor en su superficie.

El término "funciones efectoras inmunes" incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmunitario que resultan, por ejemplo, en la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, incluida la inhibición de diseminación y metástasis del tumor. Preferiblemente, las funciones efectoras inmunes dan como resultado la muerte de células cancerosas, en particular células madre cancerosas. Dichas funciones comprenden citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado al tumor, citólisis de las células que portan el antígeno asociado a tumor y/o la inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor. Los agentes de unión también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a antígenos asociados a tumores en la superficie de una célula cancerosa. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado al tumor o inducir apoptosis simplemente uniéndose al antígeno asociado al tumor en la superficie de una célula cancerosa.

Un anticuerpo puede conjugarse con una fracción terapéutica o agente tal como una fracción de fármaco de toxina, en particular una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial y, en particular, que mate células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracín diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, amanitina, 1-deshidrotestostereona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En un ejemplo preferido, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otro ejemplo, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En aún otro ejemplo, el agente terapéutico es GM-CSF. En un ejemplo preferido, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A. Las fracciones de fármaco de toxina particularmente preferidas son compuestos que inhiben el ensamblaje de microtúbulos y tienen efectos antiproliferativos y/o citotóxicos.

Se prefiere particularmente un anticuerpo que se conjuga con una fracción o agente terapéutico, tal como una citotoxina, que actúa sobre células de crecimiento lento o inactivas tales como células madre cancerosas. Tales fracciones terapéuticas incluyen fracciones terapéuticas que actúan sobre ARNm y/o síntesis de proteínas. Se conocen varios inhibidores de la transcripción. Por ejemplo, la actinomicina D, que es tanto un inhibidor transcripcional como un agente de daño del ADN, se intercala dentro del ADN y por lo tanto inhibe la etapa de inicio de la transcripción. El flavopiridol se dirige a la etapa de elongación de la transcripción. La α -amanitina se une directamente a la ARN polimerasa II, lo que conduce a la inhibición de las etapas de iniciación y elongación.

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

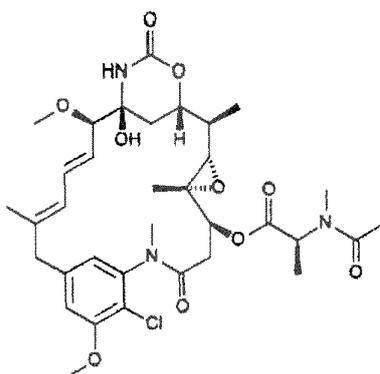
Los conjugados de anticuerpos pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción del fármaco no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción del fármaco puede ser un péptido, proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón γ ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento. Otras fracciones farmacológicas preferidas de acuerdo con la invención son curcumina, salinomicina y sulforafano.

Las técnicas para conjugar tal fracción terapéutica 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.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

En un ejemplo preferido, un anticuerpo se conjuga con una o más moléculas maitansinoides.

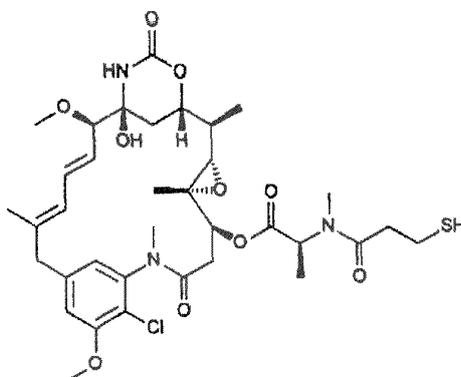
Los maitansinoides son compuestos potentes dirigidos a microtúbulos que inhiben la proliferación de células en la mitosis. Los maitansinoides son derivados de la maitansina, que es una estructura de macrólido ansa de 19 miembros unida a un anillo de benceno clorado. La maitansina tiene la siguiente fórmula:



Se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de los Estados Unidos No. 4.151.042). El maitansinol sintético y los análogos de maitansinol se han descrito, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.362.663; y 4.371.533, y Kawai et al., (1984) Chem. Pharm. Toxicol. 3441-3451.

Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Los maitansinoides particularmente preferidos de acuerdo con la invención son los derivados de maitansina que contienen tiol, tales como DM1 y DM4. Dichos derivados de maitansina que contienen tiol incluyen compuestos en los que el grupo metilo unido al grupo carbonilo se reemplaza por un grupo que contiene un grupo sulfhidrido libre tal como el grupo -R-SH en el que R representa un grupo alquileo u otro grupo de átomos que contiene carbono.

DM1, también conocido como mertansina, es un maitansinoide que tiene la siguiente fórmula:



En particular, el término "mertansina" o "DM1" se refiere al compuesto N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina.

"DM4" se refiere al compuesto N²-desacetil-N²-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina.

Los conjugados del anticuerpo anti-CLDN6-maitansinoide se preparan uniendo químicamente un anticuerpo anti-CLDN6 a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la

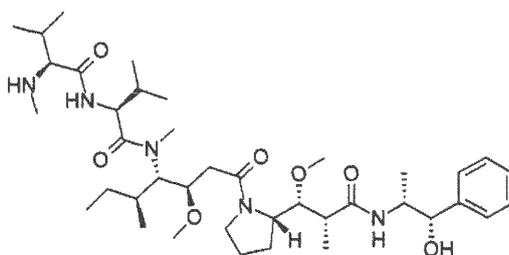
molécula de maitansinoide. Se puede conjugar un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo, aunque se espera que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejore la citotoxicidad por el uso de anticuerpos desnudos.

5 A este respecto, el término "anticuerpo unido covalentemente a al menos una fracción de fármaco de toxina" incluye situaciones en las que una o más moléculas del mismo fármaco están unidas covalentemente a una molécula de anticuerpo, así como en las que diferentes fármacos están unidos covalentemente a una molécula de anticuerpo. En la última situación, una o más moléculas de cada uno de los diferentes fármacos pueden unirse a una molécula de anticuerpo, o una combinación de las mismas (por ejemplo, una molécula de un fármaco está unida mientras que
10 varias moléculas de otro fármaco están unidas).

En algunos ejemplos, un anticuerpo se conjuga con dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolostatina, las auristatinas (patentes de los Estados Unidos Nos. 5.635.483; 5.780.588, incorporadas en el presente documento como referencia). Las auristatinas son análogos sintéticos de la dolostatina 10, un producto natural derivado de un molusco marino, *Dolabella auricularia*. Al igual que los maitansinoides, las auristatinas son disruptores de microtúbulos. La fracción del fármaco dolostatina o auristatina puede unirse al anticuerpo a través del extremo terminal N (amino) o el extremo terminal C (carboxilo) de la fracción del fármaco peptídico.

15 Los ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen fracciones de fármaco monometilauristatina tales como MMAE y MMAF que preferiblemente están unidos al extremo terminal N.

MMAE, también conocido como monometil auristatina E, tiene la siguiente fórmula:



25 En particular, el término "MMAE" se refiere al compuesto (S)-N-((3R, 4S, 5S)-1-((S)-2-((1R, 2R)-3-(((1S, 2R)-1-hidroxi-1-fenilpropan-2-il) amino)-1-metoxi-2-metil-3-oxopropil)pirrolidin-1-il)-3-metoxi-5-metil-1-oxoheptan-4-il)-N, 3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)butanamida. MMAE es en realidad desmetil-auristatina E, es decir, el grupo amino del terminal N tiene solo un sustituyente metilo en lugar de dos como en la propia auristatina E.

30 Se prefieren particularmente los conjugados anticuerpo-vcAuristatina tales como los conjugados anticuerpo-vcMMAE. De acuerdo con la invención, el término "anticuerpo-vcAuristatina" o "vcMMAE" se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende una auristatina tal como MMAE, unida a través del dipéptido escindible lisosomalmente, valina-citrulina (vc), al anticuerpo. MMAF, también conocida como monometil auristatina F, se refiere al compuesto ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-dimetil-2-((S)-3-metil-2-(metilamino)butanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil) pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-fármaco.

40 En un ejemplo, un anticuerpo está unido a un fármaco a través de un reactivo de entrecruzamiento bifuncional. Como se usa en el presente documento, un "reactivo de entrecruzamiento bifuncional" se refiere a un reactivo que posee dos grupos reactivos, uno de los cuales es capaz de reaccionar con un anticuerpo, mientras que el otro es capaz de reaccionar con el fármaco para unir el anticuerpo con el fármaco formando así un conjugado. Se puede usar cualquier reactivo de entrecruzamiento bifuncional adecuado en relación con la invención, siempre que el reactivo enlazador proporcione la retención del fármaco, por ejemplo, citotoxicidad y características de direccionamiento del anticuerpo. Preferiblemente, la molécula enlazadora une el fármaco al anticuerpo a través de enlaces químicos, de modo que el fármaco y el anticuerpo están acoplados químicamente (por ejemplo, unidos covalentemente) entre sí.

50 En un ejemplo, el reactivo de entrecruzamiento bifuncional comprende enlazadores no escindibles. Un enlazador no escindible es cualquier fracción química que es capaz de unir un fármaco, tal como un maitansinoide, a un anticuerpo de manera estable y covalente. Preferiblemente, un enlazador no escindible no es escindible en condiciones fisiológicas, en particular dentro de una célula. Por lo tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, la escisión inducida por luz, la escisión inducida por peptidasa, la escisión inducida por esterasa y la escisión de enlaces disulfuro, en condiciones en las que el fármaco o el anticuerpo permanecen activos. Los reactivos de entrecruzamiento adecuados que forman enlaces no escindibles entre un fármaco y un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. En un ejemplo, el fármaco está unido al anticuerpo a través de un enlace tioéter. Los ejemplos de enlazadores no escindibles incluyen enlazadores que tienen una fracción basada en maleimido o haloacetilo para la reacción con el fármaco tal como con el grupo sulfhidrilo de un maitansinoide.

Dichos agentes de entrecruzamiento bifuncionales son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC). Preferiblemente, el reactivo de entrecruzamiento bifuncional es SMCC. Usando dicho enlazador, un fármaco tal como la mertansina se puede enlazar a través del ácido 4-(3-mercapto-2,5-dioxo-1-pirrolidinilmetil)-ciclohexanocarboxílico a grupos amino tales como grupos NH₂ libres de residuos de lisina de un anticuerpo. Cada molécula conjugada de fármaco de anticuerpo puede comprender una única molécula de anticuerpo unida a varias moléculas de mertansina.

En un ejemplo particularmente preferido, el reactivo de enlace es un enlazador escindible. Preferiblemente, un enlazador escindible es escindible en condiciones fisiológicas, en particular dentro de una célula. Los ejemplos de enlazadores escindibles adecuados incluyen enlazadores disulfuro, enlazadores lábiles a ácido, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles a peptidasa y enlazadores lábiles a esterasa. Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles a través del intercambio de disulfuro, que puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Los enlazadores lábiles a ácido son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y los lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5) y proporcionan condiciones adecuadas para escindir los enlazadores lábiles a ácido. Los enlazadores fotolábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar en el tejido. Los enlazadores lábiles a peptidasa se pueden usar para escindir ciertos péptidos dentro o fuera de las células. En un ejemplo, el enlazador escindible se escinde en condiciones suaves, es decir, condiciones dentro de una célula en las que la actividad del agente citotóxico no se ve afectada.

En un ejemplo particularmente preferido, el enlazador es un enlazador que comprende o consiste en el dipéptido valina (Val)-citrulina (Cit) (vc), que es escindido por la catepsina dentro de las células tumorales.

De acuerdo con la invención, el término "terapia contra el cáncer dirigida contra células madre cancerosas" se refiere a cualquier terapia que pueda usarse para atacar y preferiblemente matar y/o debilitar la proliferación o viabilidad de células madre cancerosas. Dicha terapia incluye i) anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas que están desnudos o conjugados con una fracción terapéutica que se dirige a ciertos objetivos de la superficie celular en células madre cancerosas, por ejemplo, CLDN6 (por ejemplo, anticuerpos o conjugados de anticuerpos que tienen la capacidad de unirse a CLDN6 como se describió anteriormente) o ii) moléculas pequeñas que debilitan la proliferación o la viabilidad de una célula madre cancerosa. En una realización específica, el agente se une a un antígeno que se expresa a un nivel mayor en las células madre cancerosas que en las células madre normales. En una realización específica, el agente se une específicamente a un antígeno de células madre cancerosas.

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

De acuerdo con la presente invención, un anticuerpo es capaz de unirse a un objetivo predeterminado si tiene una afinidad significativa por dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación de equilibrio (K_D). Preferiblemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior o 10^{-12} M o inferior.

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

Un anticuerpo es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado mientras que no es capaz de unirse a otros objetivos, es decir, no tiene una afinidad significativa por otros objetivos y no se une significativamente a otros objetivos en ensayos estándar. De acuerdo con la invención, un anticuerpo es específico para CLDN6 si es capaz de unirse a CLDN6 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos. Preferiblemente, un anticuerpo es específico para CLDN6 si la afinidad y la unión a tales otros objetivos no excede significativamente la afinidad o la unión a proteínas no relacionadas con CLDN6 tales como albúmina de suero bovino (BSA), caseína, albúmina de suero humano (HSA) o proteínas transmembrana no claudina tales como moléculas del MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferiblemente, un anticuerpo es específico para un objetivo predeterminado si se une a dicho objetivo con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces menor que la K_D para unirse a un objetivo para el que no es específico. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un anticuerpo al objetivo para el que es específico es 10^{-7} M, la K_D para la unión a un objetivo para el que no es específico sería al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M. La unión de un anticuerpo a un objetivo puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado;

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

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

Como se usa en este documento, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

El término "natural" como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio es natural.

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

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

Preferiblemente, la unión de un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse con CLDN6 a células que expresan CLDN6 induce o media la muerte de células que expresan CLDN6. Las células que expresan CLDN6 son preferiblemente células madre cancerosas y son, en particular, células de las enfermedades cancerosas descritas en el presente documento tales como células madre cancerosas de cáncer de ovario. Preferiblemente, el anticuerpo induce o media la muerte de las células induciendo una o más de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis e inhibición de la proliferación de células que expresan CLDN6. Preferiblemente, la lisis de células mediada por ADCC tiene lugar en presencia de células efectoras, que en realizaciones particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN. La inhibición de la proliferación de células puede medirse *in vitro* determinando la proliferación de células en un ensayo usando bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse al ADN recién sintetizado de las células en replicación (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. La detección del químico incorporado utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos para BrdU indica células que replican activamente su ADN.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad por CLDN6;
- b) una afinidad de unión a CLDN6 de aproximadamente 100 nM o menos, preferiblemente, aproximadamente 5-10 nM o menos y, más preferiblemente, aproximadamente 1-10 nM o menos;
- c) la capacidad de inducir o mediar CDC en células positivas para CLDN6;
- d) la capacidad de inducir o mediar ADCC en células positivas para CLDN6;
- e) la capacidad de inhibir el crecimiento de células positivas para CLDN6;
- f) la capacidad de inducir apoptosis de células positivas para CLDN6.

En una realización, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 tiene la capacidad de unirse a un epítipo presente en CLDN6, preferiblemente un epítipo ubicado dentro de los dominios extracelulares de CLDN6, en particular el primer bucle extracelular, preferiblemente posiciones de aminoácidos 28 a 76 de CLDN6 o el segundo bucle extracelular, preferiblemente las posiciones de aminoácidos 141 a 159 de CLDN6. En realizaciones particulares, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN9. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une a un epítipo en CLDN6 que no está presente en CLDN4 y/o CLDN3. Más preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une

a un epítopo en CLDN6 que no está presente en una proteína CLDN distinta de CLDN6.

Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une preferiblemente a CLDN6 pero no a CLDN9 y preferiblemente no se une a CLDN4 y/o CLDN3. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 es específico para CLDN6. Preferiblemente, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une a CLDN6 expresado en la superficie celular. En realizaciones preferidas particulares, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une a epítotos nativos de CLDN6 presentes en la superficie de las células vivas.

En un ejemplo preferido, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9 y un fragmento de la misma

En un ejemplo preferido, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 11, 12, y un fragmento de la misma.

En ciertos ejemplos preferidos, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 comprende una combinación de una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) seleccionada entre las siguientes posibilidades (i) a (vii):

- (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma,
- (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6 o un fragmento de la misma,
- (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 o un fragmento del mismo y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 o un fragmento del mismo,
- (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10 o un fragmento de la misma,
- (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma,
- (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11 o un fragmento de la misma,
- (vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o un fragmento de la misma.

En una realización particularmente preferida, un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 comprende la siguiente combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL): la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o un fragmento de la misma.

El término "fragmento" se refiere, en particular, a una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL). En una realización, dicha una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3. En una realización particularmente preferida, el término "fragmento" se refiere a las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada (VH) y/o de la región variable de la cadena ligera (VL).

En una realización, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en el presente documento comprende dichas CDR junto con sus regiones marco intermedias. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de las primera y cuarta regiones marco, siendo el 50% el 50% del terminal C de la primera región marco y el 50% del terminal N de la cuarta región marco. La construcción de anticuerpos elaborados mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos terminales N o C en las regiones variables codificadas por los enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluida la introducción de enlazadores para unir regiones variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o etiquetas de proteínas.

En una realización, un anticuerpo que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en el presente documento comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.

La referencia en el presente documento a un anticuerpo que comprende con respecto a la cadena pesada de la misma una cadena particular, o una región o secuencia particular se refiere preferiblemente a la situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica

correspondientemente a la cadena ligera de un anticuerpo.

Debe entenderse que los anticuerpos descritos en el presente documento pueden suministrarse a un paciente administrando un ácido nucleico tal como ARN que codifica el anticuerpo y/o administrando una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como ARN que codifica el anticuerpo. Por lo tanto, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo cuando se administra a un paciente puede estar presente en forma desnuda o en un vehículo de suministro adecuado, tal como en la forma de liposomas o partículas virales, o dentro de una célula huésped. El ácido nucleico proporcionado puede producir el anticuerpo durante períodos prolongados de manera sostenida mitigando la inestabilidad al menos parcialmente observada para anticuerpos terapéuticos. Los ácidos nucleicos que se administrarán a un paciente pueden producirse por medios recombinantes. Si un ácido nucleico se administra a un paciente sin estar presente dentro de una célula huésped, preferiblemente es absorbido por las células del paciente para la expresión del anticuerpo codificado por el ácido nucleico. Si se administra un ácido nucleico a un paciente mientras está presente dentro de una célula huésped, preferiblemente es expresado por la célula huésped dentro del paciente para producir el anticuerpo codificado por el ácido nucleico.

El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir ADN y ARN tales como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN incluye ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) o ARN sintético.

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

En el contexto de la presente invención, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferiblemente está compuesta total o sustancialmente de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β-D-ribofuranosilo. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tal como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de forma recombinante, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, eliminación, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el o los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN también pueden comprender nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos de origen no natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden denominarse análogos o análogos de ARN natural.

De acuerdo con la presente invención, el término "ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito" que puede producirse usando ADN como molde y codifica un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región no traducida 5' (5'-UTR), una región codificante de proteínas o péptidos y una región no traducida 3' (3'-UTR). El ARNm tiene un tiempo de vida limitado en las células e *in vitro*. Preferiblemente, el ARNm se produce por transcripción *in vitro* usando una plantilla de ADN. En un ejemplo, el ARN se obtiene por transcripción *in vitro* o síntesis química. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por la persona experta. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción *in vitro* disponibles comercialmente.

En un ejemplo, el ARN es ARN autorreplicante, tal como el ARN autorreplicante monocatenario. En una realización, el ARN autorreplicante es ARN monocatenario de sentido positivo. En un ejemplo, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En un ejemplo, el ARN autorreplicante es ARN genómico alfa viral o se deriva del ARN genómico alfa viral. En un ejemplo, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En un ejemplo, el virus es el virus del bosque SemLiki. En un ejemplo, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes en el que al menos uno de dichos transgenes codifican el anticuerpo descrito en el presente documento. En un ejemplo, si el ARN es ARN viral o derivado de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcial o completamente secuencias virales tales como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En un ejemplo, el ARN autorreplicante es ARN transcrito *in vitro*.

El genoma de los alfavirus es ARN monocatenario de sentido positivo (ssARN (+)) que codifica dos marcos de lectura abiertos (ORF) para poliproteínas grandes. El ORF en el extremo 5' del genoma codifica las proteínas no estructurales nSP1 a nSP4 (nSP1-4), que se traducen y procesan en una ARN polimerasa dependiente de ARN (replicasa); el ORF en el extremo 3' codifica las proteínas estructurales: cápside y glicoproteínas. Ambos ORF están separados por el llamado promotor subgenómico (SGP), que gobierna la transcripción del ORF estructural. Cuando se explotan como vectores genéticos, las proteínas estructurales detrás de la SGP se reemplazan comúnmente por transgenes. Para

empaquetar tales vectores en partículas virales, las proteínas estructurales se expresan comúnmente en trans de constructos auxiliares. Los alfavirus se replican en el citoplasma de las células infectadas exclusivamente a nivel de ARN. Después de la infección, el genoma de ssARN(+) actúa como ARNm para la traducción del precursor de poliproteínas nsP1234 que se encuentra en las primeras etapas del ciclo de vida viral procesado autoproteolíticamente en los fragmentos nsP123 y nsP4. Los fragmentos nsP123 y nsP4 forman el complejo replicasa de cadena (-) que transcribe el ARN de cadena (-) de la plantilla de ARN genómico. En etapas posteriores, la poliproteína nsP1234 se escinde por completo en las proteínas individuales que se unen al complejo replicasa de cadena (+) que sintetiza genomas nuevos de cadena (+), así como transcritos subgenómicos que codifican las proteínas estructurales o transgenes. El ARN subgenómico, así como el nuevo ARN genómico, está protegido y poliadenilado y, por lo tanto, reconocido como ARNm después de la infección de las células objetivo. Solo el nuevo ARN genómico contiene una señal de empaquetamiento que asegura el empaquetamiento exclusivo del ARN genómico en viriones en gemación. El atractivo de los replicones alfavirales para vectorología se basa en la orientación positiva del genoma de ARN protegido y poliadenilado. El ARN traducible del replicón se puede sintetizar fácilmente *in vitro*, por lo que se puede lograr la protección con un análogo de protección añadido a la reacción de transcripción *in vitro* y las colas poli-A se pueden codificar como pistas poli-T en las plantillas del plásmido. Los replicones transcritos *in vitro* (IVT) se transfectan mediante técnicas de transfección convencionales e incluso pequeñas cantidades de ARN IVT de partida se multiplican rápidamente. Dentro de unas pocas horas después de la transferencia, los transgenes que se colocan secuencia abajo del SGP se transcriben a números de copia muy altos de aproximadamente 40.000 a 200.000 copias de ARN subgenómico por célula, por lo que no es sorprendente que las proteínas recombinantes se expresen fuertemente. Dependiendo del objetivo específico, los replicones IVT pueden transfectarse directamente en células objetivo o empaquetarse en partículas alfavirales con vectores auxiliares que proporcionan genes estructurales en trans. La transferencia a la piel o los músculos conduce a una expresión local alta y sostenida, paralela a una fuerte inducción de la respuesta inmune humoral y celular.

Para aumentar la expresión y/o la estabilidad del ARN, puede modificarse, preferiblemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresado.

El término "modificación" en el contexto de ARN incluye cualquier modificación de ARN que no está naturalmente presente en dicho ARN.

El ARN utilizado no tiene 5'-trifosfatos desprotegidos. La eliminación de dichos 5'-trifosfatos desprotegidos se puede lograr tratando el ARN con una fosfatasa.

El ARN puede haber modificado los ribonucleótidos naturales o sintéticos para aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad. Por ejemplo, en una realización, en el ARN utilizado de acuerdo con la invención, la 5-metilcitosina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente completamente, por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una realización, en el ARN usado de acuerdo con la invención, la pseudouridina se sustituye parcial o completamente, preferiblemente completamente, por uridina.

El término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con un protector de 5' o análogo de protector de 5'. El término "protector de 5'" se refiere a una estructura de protección que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un enlace inusual de 5' con 5' trifosfato. En un ejemplo, esta guanosina se metila en la posición 7. El término "protector convencional de 5'" se refiere a un protector de 5' de ARN natural, preferiblemente al protector 7-metilguanosa (m7G). El término "protector de 5'" incluye un análogo de protector de 5' que se asemeja a la estructura del protector de ARN y se modifica para poseer la capacidad de estabilizar el ARN si está unido a la misma, preferiblemente *in vivo* y/o en una célula.

Se puede proporcionar un ARN con un protector de 5' o un análogo de protector de 5' mediante la transcripción *in vitro* de una plantilla de ADN en presencia de dicho protector de 5' o un análogo de protector de 5', en el que dicho protector de 5' está cotranscripcionalmente incorporado en la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, mediante transcripción *in vitro*, y el protector de 5' puede unirse después de la transcripción al ARN usando enzimas de protección, por ejemplo, enzimas de protección del virus vacuna.

El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente invención puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) natural o una alteración de las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3', tales como la introducción de un UTR que no está relacionado con la región codificante de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de uno o más, preferiblemente dos copias de un 3'-UTR derivado de un gen de globina, tal como alfa2-globina, alfa1-globina, beta-globina, preferiblemente beta-globina, más preferiblemente beta-globina humana.

Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o la expresión del ARN, puede modificarse para que esté presente junto con una secuencia de poli-A, preferiblemente con una longitud de 10 a 500, más preferiblemente de 30 a 300, incluso más preferiblemente de 65 a 200 y especialmente de 100 a 150 residuos de adenosina. En un ejemplo especialmente preferido, la secuencia de poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Además, la incorporación de dos o más regiones no traducidas 3'-(UTR) en la región no traducida 3' de una molécula de ARN

puede dar como resultado una mejora en la eficiencia de la traducción. En una realización particular, la 3'-UTR se deriva del gen de la β -globina humana.

5 Preferiblemente, el ARN si se administra, es decir, se transfecta a una célula, en particular una célula presente *in vivo*, expresa la proteína o péptido que codifica.

10 El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los fines de la presente invención, el término "transfección" también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la absorción de un ácido nucleico por dicha célula, en la que la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Por lo tanto, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en el presente documento puede estar presente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. La transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas aplicaciones de transfección, es suficiente si el material genético transfectado se expresa solo transitoriamente. Dado que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección generalmente no está integrado en el genoma nuclear, el ácido nucleico foráneo se diluirá a través de la mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episomal de los ácidos nucleicos reducen en gran medida la velocidad de dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado realmente permanezca en el genoma de la célula y sus células hijas, debe producirse una transfección estable. El ARN puede transfectarse en células para expresar transitoriamente su proteína codificada.

20 El término "estabilidad" del ARN se refiere a la "vida media" del ARN. "Vida media" se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad o número de moléculas. En el contexto de la presente invención, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influir en la "duración de la expresión" del ARN. Se puede esperar que el ARN que tiene una vida media larga se exprese durante un período de tiempo prolongado.

25 En el contexto de la presente invención, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en el que el código genético en una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. El término "transcripción" comprende "transcripción *in vitro*", en la que el término "transcripción *in vitro*" se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células, preferiblemente usando extractos celulares apropiados. Preferiblemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y están abarcados por el término "vector".

30 El término "traducción" se refiere al proceso en los ribosomas de una célula por el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para formar un péptido o proteína.

35 El término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. El término expresión también incluye una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

40 "Expresión aberrante" o "expresión anormal" significa que la expresión está alterada, preferiblemente aumentada, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un sujeto que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una determinada proteína, por ejemplo, un antígeno tumoral. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos 10%, en particular al menos 20%, al menos 50% o al menos 100%, o más. En un ejemplo, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

45 El término "expresada específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno tumoral expresado específicamente en placenta significa que dicha proteína se expresa principalmente en placenta y no se expresa en otros tejidos o no se expresa en un grado significativo en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en células de la placenta y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido se expresa específicamente en células de la placenta. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral también se puede expresar específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejido u órganos, pero preferiblemente en no más de 3 tipos diferentes de tejido u órganos. En este caso, el antígeno tumoral se expresa específicamente en estos órganos.

50 El término "codificación de ARN" significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, preferiblemente dentro de una célula, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

55 Algunos aspectos se basan en la transferencia adoptiva de células huésped que se transfectan *in vitro* con un ácido nucleico tal como ARN que codifica un anticuerpo descrito en este documento y se transfieren a receptores tales como pacientes, preferiblemente después de la expansión *ex vivo* desde bajas frecuencias precursoras hasta números de células clínicamente relevantes. Las células huésped utilizadas para el tratamiento pueden ser autólogas, alogénicas

o singénicas para un receptor tratado.

El término "autólogo" se usa para describir cualquier cosa que se deriva del mismo sujeto. Por ejemplo, "trasplante autólogo" se refiere a un trasplante de tejido u órganos derivados del mismo sujeto. Tales procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que de otro modo da como resultado el rechazo.

El término "alogénico" se usa para describir cualquier cosa que se derive de diferentes individuos de la misma especie. Se dice que dos o más individuos son alogénicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos.

El término "singénico" se usa para describir cualquier cosa que se deriva de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos o animales idénticos de la misma cepa endogámica, o sus tejidos.

El término "heterólogo" se usa para describir algo que consiste en múltiples elementos diferentes. Como ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a un individuo diferente constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

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

La enseñanza dada en el presente documento con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, aquellas que se muestran en la lista de secuencias, deben interpretarse para que también se relacionen con variantes de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a aquellas de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo, retiene la unión de dicho anticuerpo a CLDN6 y preferiblemente las funciones de dicho anticuerpo como se divulga en este documento, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.

Por ejemplo, las secuencias mostradas en el listado de secuencias pueden modificarse para eliminar uno o más, preferiblemente todos los residuos de cisteína libres, en particular reemplazando los residuos de cisteína por aminoácidos distintos de cisteína, preferiblemente serina, alanina, treonina, glicina, tirosina, leucina o metionina, más preferiblemente alanina o serina.

Los expertos en la materia apreciarán que, en particular, las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLDN6.

Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en el presente documento. Por "altamente homólogo" se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de modo que muestren una homología sustancial con las regiones de anticuerpos específicamente divulgadas en este documento.

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

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

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

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

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por que al menos un residuo en la secuencia se remueve

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

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente identidad entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. El grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100% de la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consta de 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente por al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180 o aproximadamente 200 aminoácidos, preferiblemente aminoácidos continuos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia. La alineación para determinar la similitud de secuencia, preferiblemente la identidad de secuencia, se puede hacer con herramientas conocidas de la técnica, preferiblemente usando la mejor alineación de secuencia, por ejemplo, usando Align, usando configuraciones estándar, preferiblemente EMBOSS::needle, Matriz: Blosum62, apertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,5.

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

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

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

El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferiblemente a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferiblemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferiblemente, dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que pueda transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferiblemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término "célula" incluye células bacterianas; otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamífero. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas Gram negativas tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas Gram positivas tales como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Lactococcus*. Las células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizo Saccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*. Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, HEK293 y similares. Sin embargo, también pueden usarse células de anfibios, células de insectos, células vegetales y cualquier otra célula usada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas. Las células de mamíferos son

particularmente preferidas para la transferencia adoptiva, tales como las células de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una gran cantidad de tipos de tejidos e incluyen células primarias y líneas celulares tales como células del sistema inmune, en particular células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas y células T, células madre tales como células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales y otros tipos de células. Una célula presentadora de antígeno es una célula que presenta un antígeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR).

El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos humanos anti-CLDN6 cuando se inmunizan con antígeno CLDN6 y/o células que expresan CLDN6. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tal como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CLDN6 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) al someterse a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

"Reducir", "disminuir" o "inhibir" como se usa en el presente documento significa una disminución general o la capacidad de causar una disminución general, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y lo más preferiblemente de 75% o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de expresión o en el nivel de proliferación de células.

Términos tales como "aumentar" o "mejorar" se refieren preferiblemente a un aumento o mejora en aproximadamente al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 80%, y lo más preferiblemente al menos 100%, al menos 200%, al menos 500%, al menos 1.000%, al menos 10.000% o incluso más.

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

Los anticuerpos descritos en el presente documento interactúan preferiblemente con componentes del sistema inmune, preferiblemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos descritos en este documento también pueden usarse para atacar cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, medicamentos o toxinas) para matar directamente las células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunes antitumorales que pueden haber sido comprometidas debido a los efectos secundarios citotóxicos de compuestos quimioterapéuticos sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a CLDN6 en la superficie celular, por lo tanto, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

ADCC describe la capacidad de matar células de las células efectoras como se describe en este documento, en particular linfocitos, que preferiblemente requieren que la célula objetivo esté marcada por un anticuerpo.

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

Citotoxicidad dependiente del complemento

CDC es otro método de muerte celular que puede ser dirigida por anticuerpos. IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también son muy eficaces para dirigir la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo da como resultado el desbloqueo de múltiples sitios de unión a C1q en las proximidades de los dominios C_{H2} de las moléculas de anticuerpo participantes, tales como las moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente, estos sitios de unión de C1q sin recubrimiento convierten la interacción de C1q-IgG previamente de baja afinidad en una de alta avidéz, que desencadena una cascada de eventos que involucran

una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque de membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula.

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

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

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

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

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

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

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

50 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales pueden seleccionarse luego mediante ELISA para detectar hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS usando células que expresan antígeno, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden ser sembrados nuevamente en placa, seleccionados nuevamente, y si aún son positivos para anticuerpos monoclonales pueden subclonarse mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

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

65 Por ejemplo, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, se pueden ligar en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el utilizado por el sistema de expresión del gen GS divulgado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped

eucariotas tales como células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas tal como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. Los métodos utilizados para introducir estos genes pueden ser métodos descritos en la técnica, tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que luego pueden amplificarse para su nivel de expresión y aumentar su escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase por ejemplo Verma, R. et al., (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock et al., (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; y Fischer, R., et al., (1999) *Biol. Chem* 380: 825-839.

15 Quimerización

Los anticuerpos murinos son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse por completo si los anticuerpos respectivos se quimerizan o humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra mediante la unión de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, de acuerdo con lo descrito por Kraus et al., en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En un ejemplo preferido, los anticuerpos quiméricos se generan uniendo la región constante de la cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En una realización también preferida, los anticuerpos quiméricos pueden generarse uniendo la región constante de la cadena ligera lambda humana a la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes preferidas de la cadena pesada para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes preferidas de la cadena pesada para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

Humanización

Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de la CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al., (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias del gen de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo de manera uniforme en la región variable.

La capacidad de los anticuerpos para unirse a un antígeno se puede determinar usando ensayos de unión estándar (por ejemplo, ELISA, transferencia Western, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

Para purificar anticuerpos, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, los anticuerpos se pueden producir en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

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

Para determinar el isotipo de anticuerpos, se pueden realizar ELISA de isotipo con varios kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pozos de las placas de microtitulación pueden recubrirse con Ig anti-ratón. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a

temperatura ambiente durante dos horas. Los pozos pueden reaccionar con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, IgA de ratón o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgM de ratón. Después del lavado, las placas pueden desarrollarse con sustrato ABTS (1 mg/mL) y analizarse a una DO de 405-650. Alternativamente, el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, Cat. No. 1493027) puede usarse como lo describe el fabricante.

5 Para demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, se puede usar citometría de flujo. Las líneas celulares que se expresan de forma natural o después de la transfección de antígeno y controles negativos que carecen de expresión de antígeno (cultivadas bajo condiciones estándar de crecimiento) se pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene FBS al 1%, y se pueden incubar a 4 °C durante 10 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido al antígeno en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar mediante citometría de flujo con un instrumento FACS utilizando propiedades de dispersión de luz y lateral para bloquear células vivas individuales. Para distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno de los ligantes no específicos en una sola medición, se puede emplear el método de cotransfección. Las células 15 transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican el antígeno y un marcador fluorescente pueden teñirse como se describió anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpos. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de antígeno se unen preferencialmente a las células que expresan 20 marcadores de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia además o en vez del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

25 Para demostrar la presencia de anticuerpos en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan antígeno, se puede usar el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que se expresan ya sea espontáneamente o después de la transfección del antígeno y los controles negativos que carecen de expresión de antígeno se cultivan en portaobjetos con cámara bajo condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 30 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células pueden fijarse con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Las células pueden reaccionar con anticuerpos monoclonales contra el antígeno durante 30 minutos. a 25 °C. Después del lavado, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) bajo las mismas condiciones. Las células pueden entonces ser examinadas por microscopía de fluorescencia.

35 Los extractos celulares de las células que expresan el antígeno y los controles negativos apropiados se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a las membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se explorarán con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión de IgG se puede detectar usando peroxidasa de IgG anti-ratón y desarrollarse con sustrato de ECL.

40 Los anticuerpos pueden ensayarse adicionalmente para determinar la reactividad con el antígeno mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, utilizando criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebido en parafina fijadas con paraformaldehído de muestras 45 de tejido no canceroso o tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos de rutina o de ratones portadores de tumores xenoinjertos inoculados con líneas celulares que se expresan espontáneamente o después del antígeno de transfección. Para la inmunotinción, los anticuerpos reactivos al antígeno pueden incubarse seguidos de anticuerpos anti-ratón de cabra o anti-conejo de cabra (DAKO) conjugados con peroxidasa rábano picante de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

50 Los anticuerpos pueden ser probados por su capacidad para mediar la fagocitosis y la muerte de células que expresan CLDN6. La prueba de la actividad de anticuerpos monoclonales *in vitro* proporcionará una detección inicial antes de probar modelos *in vivo*.

55 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos, pueden purificarse mediante centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas se pueden suspender en RPMI suplementado con suero de ternera fetal al 10% inactivado por calor o, alternativamente, con suero humano al 5% inactivado por calor y mezclando con células objetivo marcadas con ⁵¹Cr que expresan CLDN6, en varias proporciones de células efectoras con respecto a las células objetivo. Alternativamente, las células objetivo pueden marcarse con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un fluorómetro puede medir un quelato de Europio altamente fluorescente con el ligando potenciador que se libera de las células muertas. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células objetivo con luciferasa. El amarillo lucifer añadido puede ser oxidado por células viables solamente. Las IgG anti-CLDN6 purificadas se pueden agregar a varias concentraciones. La IgG humana irrelevante puede usarse como

control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4 a 20 horas a 37 °C, dependiendo del tipo de célula efectora utilizada. Las muestras pueden analizarse para determinar la citólisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación de amarillo lucifer puede ser una medida de células viables.

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 también se pueden analizar en varias combinaciones para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden analizarse para determinar su capacidad para mediar la CDC usando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para complemento se puede obtener de la sangre de una manera conocida por el experto. Para determinar la actividad de CDC de los mAb, se pueden usar diferentes métodos. La liberación de ⁵¹Cr se puede medir, por ejemplo, o se puede evaluar la permeabilidad de membrana elevada usando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células objetivo se pueden lavar y se pueden incubar a 5 x 10⁵/mL con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos a temperatura ambiente o a 37 °C. Luego se puede agregar suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células se incuban a 37 °C durante 20-30 minutos. Todas las células de cada muestra se pueden agregar a la solución de PI en un tubo FACS. La mezcla se puede analizar inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo utilizando FACSArray.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC puede determinarse en células adherentes. En una realización de este ensayo, las células se siembran 24 horas antes del ensayo con una densidad de 3 x 10⁴/pozo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. Al día siguiente, se retira el medio de crecimiento y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contiene saponina al 0,2% para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Después de incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, se elimina el sobrenadante y se agrega plasma o suero humano al 20% (v/v) en DMEM (precalentado a 37 °C) a las células y se incuban durante otros 20 minutos a 37 °C. Todas las células de cada muestra se agregan a una solución de yoduro de propidio (10 µg/mL). Luego, los sobrenadantes se reemplazan por PBS que contiene 2,5 µg/mL de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm se mide a 600 nm usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula de la siguiente manera: % de lisis específica = (muestra de fluorescencia - fondo de fluorescencia)/(lisis máxima de fluorescencia - fondo de fluorescencia) x 100.

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

Para evaluar la capacidad de iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-CLDN6 pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas para CLDN6 o células tumorales transfectadas con CLDN6 a 37 °C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden cosecharse, lavarse en tampón de unión de anexina V (BD Biosciences) e incubarse con anexina V conjugada con FITC o APC (BD Biosciences) durante 15 minutos en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden agregarse a la solución de PI (10 µg/mL en PBS) en un tubo FACS y evaluarse inmediatamente por citometría de flujo (como se indicó anteriormente). Alternativamente, se puede detectar una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta usando el anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y el ADN se desnaturaliza con la solución Fix. El anticuerpo no unido se lava y se agrega el inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, en el que forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida, utilizando fluorimetría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

Estudios preclínicos

Los agentes de unión descritos en el presente documento también se pueden analizar en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones inmunodeficientes que portan tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLDN6 para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan CLDN6).

Se pueden realizar estudios *in vivo* después de xenoinjerto de células tumorales que expresan CLDN6 en ratones inmunocomprometidos u otros animales usando anticuerpos descritos en este documento. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones libres de tumores seguido de inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para prevenir la formación de tumores o síntomas relacionados con tumores. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones con tumores para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, la metástasis o los síntomas relacionados con el tumor. La aplicación de anticuerpos se puede combinar con la aplicación de otras sustancias tales como fármacos citostáticos, inhibidores del factor de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la posible toxicidad de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por anticuerpos,

- 5 los animales pueden inocularse con anticuerpos o reactivos de control e investigarse a fondo para detectar posibles síntomas relacionados con la terapia con anticuerpos CLDN6. Los posibles efectos secundarios de la aplicación *in vivo* de los anticuerpos CLDN6 incluyen particularmente la toxicidad en los tejidos que expresan CLDN6, incluida la placenta. Anticuerpos que reconocen CLDN6 en humanos y en otras especies, por ejemplo, ratones, son particularmente útiles para predecir posibles efectos secundarios mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales CLDN6 en humanos.
- 10 El mapeo de epítomos reconocidos por anticuerpos se puede realizar como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) by Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 por Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.
- 15 Los compuestos y agentes descritos en este documento pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.
- 20 Las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de los anticuerpos descritos en este documento y opcionalmente de agentes adicionales como se discute en el presente documento para generar la reacción deseada o el efecto deseado.
- 25 Las composiciones farmacéuticas se proporcionan habitualmente en una forma de dosificación uniforme y se pueden preparar de una manera ya conocida. Una composición farmacéutica puede por ejemplo, estar en forma de solución o suspensión.
- 30 Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tampón, conservantes, vehículos, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.
- 35 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden usarse para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de forma no limitativa las preparadas a partir de los siguientes ácidos: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.
- 40 Las sustancias tampón adecuadas para usar en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.
- 45 Los conservantes adecuados para usar en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.
- 50 Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como lactato de Ringer.
- 55 El término "vehículo" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina para facilitar, mejorar o permitir la aplicación.
- 60 De acuerdo con la invención, el término "vehículo" también incluye uno o más rellenos, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles, que son adecuadas para la administración a un paciente.
- 65 Las posibles sustancias portadoras para la administración parenteral son por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros láctidos biocompatibles, copolímeros de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.
- El término "excipiente" cuando se usa en el presente documento pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, vehículos, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes saborizantes o colorantes.
- Los agentes y composiciones descritos en el presente documento pueden administrarse a través de cualquier ruta convencional, tal como mediante administración parenteral, incluyendo inyección o infusión. La administración es preferiblemente parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.
- Las composiciones adecuadas para la administración parenteral generalmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de vehículos y solventes compatibles son la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, generalmente se usan aceites fijos estériles como solución o medio de suspensión.
- Los agentes y composiciones descritos en este documento se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad

efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una condición particular, la reacción deseada se refiere preferiblemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección también puede ser la demora del inicio o la prevención de la aparición de dicha enfermedad o afección. En particular, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recurrencia o aparición de cáncer y uno o más síntomas del mismo, reducir la gravedad, la duración del cáncer, mejorar uno o más síntomas de cáncer, prevenir el avance del cáncer, causar regresión del cáncer y/o prevenir metástasis de cáncer. En una realización de la invención, la cantidad de una terapia es efectiva para lograr una estabilización, reducción o eliminación de la población de células madre cancerosas y/o erradicación, eliminación o control de cáncer primario, cáncer metastásico y/o cáncer recurrente.

Una cantidad efectiva de un agente o composición descrita en el presente documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluyendo la edad, condición fisiológica, tamaño y peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia de acompañamiento (si está presente), la ruta específica de administración y factores similares. Por consiguiente, las dosis administradas de los agentes descritos en el presente documento pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso de que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden usar dosis más altas (o efectivamente dosis más altas logradas por una ruta de administración diferente y más localizada).

Los agentes y composiciones descritos en este documento pueden administrarse a pacientes para tratar o prevenir una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa tal como se describe en el presente documento caracterizada por la presencia de células madre cancerosas que expresan CLDN6.

Los agentes y composiciones proporcionados en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con regímenes terapéuticos convencionales tales como cirugía, irradiación, quimioterapia y/o trasplante de médula ósea (autólogo, singénico, alogénico o no relacionado).

El tratamiento del cáncer representa un campo en el que las estrategias combinadas son especialmente deseables ya que con frecuencia la acción combinada de dos, tres, cuatro o incluso más fármacos/terapias contra el cáncer genera efectos sinérgicos que son considerablemente más fuertes que el impacto de un enfoque monoterapéutico. Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, un tratamiento contra el cáncer puede combinarse eficazmente con varios otros fármacos. Entre esos están por ejemplo, combinaciones con terapias tumorales convencionales, estrategias de múltiples epítomos, inmunoterapia adicional y enfoques de tratamiento dirigidos a la angiogénesis o apoptosis (para revisión véase, por ejemplo, Andersen et al., 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 57(11): 1735-1743). La administración secuencial de diferentes agentes puede inhibir el crecimiento de células cancerosas en diferentes puntos de control, mientras que otros agentes pueden, por ejemplo, inhibir la neoangiogénesis, la supervivencia de células malignas o metástasis, convirtiendo potencialmente el cáncer en una enfermedad crónica. La siguiente lista proporciona algunos ejemplos no limitantes de fármacos y terapias contra el cáncer que pueden usarse en combinación con la presente invención:

1. Quimioterapia

La quimioterapia es el estándar de atención para múltiples tipos de cáncer. Los agentes de quimioterapia más comunes actúan matando las células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de las células cancerosas. Por lo tanto, una combinación con fármacos quimioterapéuticos convencionales como por ejemplo, los agentes alquilantes, los antimetabolitos, las antraciclinas, los alcaloides vegetales, los inhibidores de la topoisomerasa y otros agentes antitumorales que afectan la división celular o la síntesis de ADN pueden mejorar significativamente los efectos terapéuticos de la presente invención al eliminar las células supresoras, reiniciar el sistema inmune, al producir células tumorales más susceptible a la muerte mediada por el sistema inmunitario, o por la activación adicional de células del sistema inmunitario. En múltiples estudios se ha demostrado una acción sinérgica contra el cáncer de los fármacos inmunoterapéuticos quimioterapéuticos y basados en la vacunación (véase, por ejemplo, Quiox et al., 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line Chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* 12 (12): 1125-33.; véase también Liseth et al., 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 6920979; véase también Hirooka et al., 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38 (3): e69-74). Hay cientos de medicamentos quimioterapéuticos disponibles que son básicamente adecuados para terapias combinadas. Algunos ejemplos (no limitantes) de fármacos quimioterapéuticos que se pueden combinar con la presente invención son carboplatino (Paraplatino), cisplatino (Platinol, Platinol-AQ), crizotinib (Xalkori), ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), docetaxel (Taxoter), doxorubicina (Adriamicina), erlotinib (Tarceva), etopósido (VePesid), fluorouracilo (5-FU), gemcitabina (Gemzar), mesilato de imatinib (Gleevec), irinotecano (Camptosar), doxorubicina encapsulada en liposomas (Doxil), metotrexato (Folex, Mexato, Ametopterina), paclitaxel (Taxol, Abraxano), sorafinib (Nexavar), sunitinib (Sutent), topotecano (Hicamtina), trabectedina (Yondelis), vincristina (Oncovin, Vincasar PFS) y vinblastina (Velban).

2. Cirugía

La cirugía del cáncer, una operación para extirpar el tumor, sigue siendo la base del tratamiento del cáncer. La cirugía se puede combinar con otros tratamientos contra el cáncer para eliminar las células tumorales restantes. La combinación de métodos quirúrgicos con el tratamiento inmunoterapéutico posterior es un enfoque prometedor que se ha demostrado innumerables veces.

3. Radiación

La radioterapia sigue siendo un componente importante del tratamiento del cáncer con aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer que reciben radioterapia durante el curso de la enfermedad. El objetivo principal de la radioterapia es privar a las células cancerosas de su potencial de multiplicación (división celular). Los tipos de radiación utilizados para tratar el cáncer son la radiación de fotones (rayos X y rayos gamma) y las radiaciones de partículas (haces de electrones, protones y neutrones). Hay dos formas de administrar la radiación a la ubicación del cáncer. La radiación de haz externo se administra desde el exterior del cuerpo apuntando rayos de alta energía (fotones, protones o radiación de partículas) a la ubicación del tumor. La radiación interna o braquiterapia se administran desde el interior del cuerpo mediante fuentes radiactivas, selladas en catéteres o semillas directamente en el sitio del tumor. Las técnicas de radioterapia que son aplicables en combinación con la presente invención son, por ejemplo, fraccionamiento (radioterapia administrada en un régimen fraccionado, por ejemplo, fracciones diarias de 1,5 a 3 Gy administradas durante varias semanas), radioterapia conformada tridimensional (3DCRT; administración de radiación al volumen tumoral bruto), radioterapia de intensidad modulada (IMRT; modulación de la intensidad controlada por ordenador de múltiples haces de radiación), radioterapia guiada por imagen (IGRT; una técnica que comprende imágenes previas a la radioterapia que permite la corrección) y radioterapia estereotáctica corporal (SRBT, que administra dosis individuales muy altas de radiación en solo unas pocas fracciones de tratamiento). Para una revisión de radioterapia, véase Baskar et al., 2012: Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int. J Med Sci.* 9 (3): 193-199.

4. Anticuerpos

Los anticuerpos (preferiblemente anticuerpos monoclonales) logran su efecto terapéutico contra las células cancerosas a través de diversos mecanismos. Pueden tener efectos directos en la producción de apoptosis o muerte celular programada. Pueden bloquear componentes de las vías de transducción de señales, como por ejemplo, receptores del factor de crecimiento, deteniendo efectivamente la proliferación de células tumorales. En las células que expresan anticuerpos monoclonales, pueden provocar la formación de anticuerpos antiidiotipo. Los efectos indirectos incluyen el reclutamiento de células que tienen citotoxicidad, tales como monocitos y macrófagos. Este tipo de destrucción celular mediada por anticuerpos se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos también se unen al complemento, lo que conduce a una toxicidad celular directa, conocida como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La combinación de métodos quirúrgicos con medicamentos o métodos inmunoterapéuticos es un enfoque exitoso, como por ejemplo, se demuestra en Gadri et al., 2009: Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. *J Immunother.* 32(4): 333-40. La siguiente lista proporciona algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos anticancerígenos y posibles objetivos de anticuerpos (entre paréntesis) que pueden usarse en combinación con la presente invención: Abagovomab (CA-125), Abciximab (CD41), Adecatumumab (EpCAM), Afutuzumab (CD20), Alacizumab pegol (VEGFR2), pentetato de Altumomab (CEA), Amatuximab (MORAb-009), Anatumomab mafenatox (TAG-72), Apolizumab (HLA-DR), Arcitumomab (CEA), Bavituximab (fosfatidilserina), Bectumomab (CD22), Belimumab (BAFF), Bevacizumab (VEGF-A), Bivatuzumab mertansina (CD44 v6), Blinatumomab (CD19), Brentuximab vedotina (CD30 TNFRSF8), Cantuzumab mertansina (mucina CanAg), Cantuzumab ravtansina (Muc 1), Campromab pendetida (células de carcinoma prostático), Carlumab (CNTO888), Catumaxomab (EpCAM, CD3), Cetuximab (EGFR), Citatuzumab bogatox (EpCAM), Cixutumumab (receptor de IGF-1), Claudiximab (Claudina), Clivatuzumab tetraxetano (MUC1), Conutumumab (TRAIL-R2), Dacetuzumab (CD40), Dalotuzumab (receptor del factor I de crecimiento similar a insulina), Denosumab (RANKL), Detumomab (célula de linfoma B), Drozitumab (DR5), Ecomeximab (gangliósido GD3), Edrecolomab (EpCAM), Elotuzumab (SLAMF7), Enavatuzumab (PDL192), Ensituximab (NPC-1C), Epratuzumab (CD22) Ertumaxomab (HER2/neu, CD3), Etaracizumab (integrina $\alpha\beta 3$), Farletuzumab (receptor 1 de folato), FBTA05 (CD20), Ficlaturumab (SCH 900105), Figitumumab (receptor de IGF-1), Flanvotumab (glucoproteína 75), Fresolimumab (TGF- β), Galiximab (CD80), Ganitumab (IGF-I), Gemtuzumab ozogamicina (CD33), Gevokizumab (IL-1 β), Girentuximab (anhidrasa carbónica 9 (CA-IX)), Glembatumumab vedotina (GPNMB), Ibritumomab tiuxectano (CD20), Icrucumab (VEGFR-1), Igovoma (CA-125), Indatuzumab ravtansina (DEC1), Intetumumab (CD51), Inotuzumab ozogamicina (CD22), Ipilimumab (CD152), Iratumumab (CD30), Labetuzumab (CEA), Lexatumumab (TRAIL-R2), Libivirumab (antígeno de superficie de la hepatitis B), Lintuzumab (CD33), Lorvotuzumab mertansina (CD56), Lucatumumab (CD40), Lumiliximab (CD23), Mapatumumab (TRAIL-R1), Matuzumab (EGFR), Mepolizumab (IL-5), Milatuzumab (CD74), Mitumomab (gangliósido GD3), Mogamulizumab (CCR4), Moxetumomab pasudotox (CD22), Nacolomab tafenatox (antígeno C242), Naptumomab estafenatox (5T4), Namatumab (RON), Necitumumab (EGFR), Nimotuzumab (EGFR), Nivolumab (IgG4), Ofatumumab (CD20), Olaratumab (PDGFR α), Onartuzumab (receptor quinasa del factor de dispersión humano), Oportuzumab monatox (EpCAM), Oregovomab (CA-125), Oxelumab (OX-40), Panitumumab (EGFR), Patritumab (HER3), Pemtumoma

(MUC1), Pertuzumab (HER2/neu), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Pritumumab (vimentina), Racotumomab (ácido N-glicolilneuramínico), Radretumab (dominio B extra de fibronectina), Rafivirumab (glicoproteína del virus de la rabia), Ramucirumab (VEGFR2), Rilotumumab (HGF), Rituximab (CD20), Robatumumab (receptor de IGF-1), Samalizumab (CD200), Sibrotuzumab (FAP), Siltuximab (IL-6), Tabalumab (BAFF), Tacatuzumab tetraxetano (fetoproteína alfa), Taplitumomab paptox (CD19), Tenatumomab (tenascina C), Teprotumumab (CD221), Ticilimumab (CTLA-4), Tigatuzumab (TRAIL-R2), TNX-650 (IL-13), Tositumomab (CD20), Trastuzumab (HER2/neu), TRBS07 (GD2), Tremelimumab (CTLA-4), Tucotuzumab celmoleucina (EpCAM), Ublituximab (MS4A1), Urelumab (4-1 BB), Volociximab (integrina $\alpha 5\beta 1$), Votumumab (antígeno tumoral CTAA16.88), Zalutumumab (EGFR), Zanolimumab (CD4).

5. Citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras, proteínas de fusión.

El uso combinado de las composiciones farmacéuticas que codifican el antígeno con citocinas, quimiocinas, moléculas coestimuladoras y/o proteínas de fusión de las mismas para evocar efectos inmunomoduladores beneficiosos o inhibición tumoral es otro ejemplo. Con el fin de aumentar la infiltración de las células inmunes en el tumor y facilitar el movimiento de las células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos que drenan el tumor, se pueden usar varias quimiocinas con estructuras C, CC, CXC y CX3C. Algunas de las quimiocinas más prometedoras son, por ejemplo, CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21, además CCL2, CCL3, CCL5 y CCL16. Otros ejemplos son CXCR4, CXCR7 y CXCL12. Además, las moléculas coestimuladoras o reguladoras, tales como, por ejemplo, los ligandos B7 (B7.1 y B7.2) son útiles. También son útiles otras citocinas, tales como, por ejemplo, interleucinas especialmente (por ejemplo, IL-1 a IL-17), interferones (por ejemplo, IFNalfa1 hasta IFNalfa8, IFNalfa10, IFNalfa13, IFNalfa14, IFNalfa16, IFNalfa17, IFNalfa21, IFNbeta1, IFNW, IFNE1 e IFNK), factores hematopoyéticos, TGF (por ejemplo, TGF- α , TGF- β y otros miembros de la familia TGF), finalmente miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral y sus ligandos, así como otras moléculas estimuladoras, que comprenden pero no se limitan a 4-1BB, 4-1BB-L, CD137, CD137L, CTLA-4GITR, GITRL, Fas, Fas-L, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, p75NGF-R, DR6, LT.beta.R, RANK, EDAR1, XEDAR, Fn114, Troy/Trade, TAJ, TNFR1I, HVEM, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, GITR, GITRL, TACI, BAFF-R, BCMA, RELT y CD95 (Fas/APO-1), proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides, proteína mediadora de apoptosis relacionada con el receptor de TNF (TRAMP) y receptor de muerte 6 (DR6). Especialmente CD40/CD40L y OX40/OX40L son objetivos importantes para la inmunoterapia combinada debido a su impacto directo en la supervivencia y proliferación de células T. Para una revisión véase Lechner et al., 2011: Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 3 (11), 1317-1340.

6. Tratamientos bacterianos

Los investigadores han estado usando bacterias anaerobias, tales como *Clostridium novyi*, para consumir el interior de tumores pobres en oxígeno. Estos deberían morir cuando entren en contacto con los lados oxigenados del tumor, lo que significa que serían inofensivos para el resto del cuerpo. Otra estrategia es utilizar bacterias anaerobias que se han transformado con una enzima que puede convertir un profármaco no tóxico en un medicamento tóxico. Con la proliferación de la bacteria en las áreas necróticas e hipóxicas del tumor, la enzima se expresa únicamente en el tumor. Por lo tanto, un profármaco aplicado sistémicamente se metaboliza al fármaco tóxico solo en el tumor. Se ha demostrado que esto es efectivo con el *Clostridium sporogenes* anaerobio no patógeno.

7. Inhibidores de quinasa.

Otro gran grupo de objetivos potenciales para la terapia complementaria contra el cáncer comprende los inhibidores de la quinasa, porque el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas está estrechamente relacionado con la desregulación de la actividad de la quinasa. Para restaurar la actividad normal de la quinasa y, por lo tanto, reducir el crecimiento tumoral, se utiliza una amplia gama de inhibidores. El grupo de quinasas específicas comprende receptores tirosina quinasas, por ejemplo, BCR-ABL, B-Raf, EGFR, HER-2/ErbB2, IGF-IR, PDGFR- α , PDGFR- β , c-Kit, Flt-4, Flt3, FGFR1, FGFR3, FGFR4, CSF1R, c-Met, RON, c-Ret, ALK, tirosina quinasas citoplasmáticas, por ejemplo, c-SRC, c-YES, Abl, JAK-2, serina/treonina quinasas, por ejemplo, ATM, Aurora A y B, las CDK, mTOR, PKCi, las PLK, b-Raf, S6K, STK11/LKB1 y quinasas de lípidos, por ejemplo, PI3K, SKI. Los inhibidores de la quinasa de molécula pequeña son por ejemplo, PHA-739358, Nilotinib, Dasatinib y PD166326, NSC 743411, Lapatinib (GW-572016), Canertinib (CI-1033), Semaxinib (SU5416), Vatalanib (PTK787/ZK222584), Sutent (SU11248), Sorafenib (BAY 43-9006) y Leflunomida (SU101). Para más información véase por ejemplo, Zhang et al., 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9, 28-39.

8. Receptores tipo Toll

Los miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR) son un vínculo importante entre la inmunidad innata y adaptativa y el efecto de muchos adyuvantes depende de la activación de los TLR. Un gran número de vacunas establecidas contra el cáncer incorporan ligandos para TLR para reforzar las respuestas a la vacuna. Además TLR2, TLR3, TLR4, especialmente TLR7 y TLR8, se han examinado para la terapia del cáncer en enfoques de inmunoterapia pasiva. Los TLR7 y TLR8 estrechamente relacionados contribuyen a las respuestas antitumorales al afectar las células inmunes, las células tumorales y el microambiente tumoral y pueden activarse mediante estructuras análogas de nucleósidos. Todos los TLR se han usado como inmunoterapéuticos independientes o adyuvantes de vacunas contra

el cáncer y se pueden combinar de forma sinérgica con las formulaciones y métodos de la presente divulgación. Para más información véase van Duin et al., 2005: Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology*, 27 (1): 49-55.

5 9. Inhibidores de la angiogénesis

Además de las terapias que se dirigen a los receptores inmunomoduladores afectados por los mecanismos de escape mediados por el tumor y la supresión inmunológica, existen terapias que se dirigen al entorno del tumor. Los inhibidores de la angiogénesis evitan el crecimiento extenso de los vasos sanguíneos (angiogénesis) que los tumores requieren para sobrevivir. La angiogénesis promovida por las células tumorales para satisfacer sus crecientes demandas de nutrientes y oxígeno, por ejemplo, puede bloquearse atacando diferentes moléculas. Ejemplos no limitantes de moléculas mediadoras de angiogénesis o inhibidoras de la angiogénesis que pueden combinarse con la presente invención son VEGF soluble (isoformas de VEGF VEGF121 y VEGF165, receptores de VEGFR1, VEGFR2 y correceptores Neuropilina-1 y Neuropilina-2) y NRP-1, angiopoyetina 2, TSP-1 y TSP-2, angiostatina y moléculas relacionadas, endostatina, vasoestatina, calreticulina, factor plaquetario 4, TIMP y CDAI, Meth-1 y Meth-2, IFN- α , IFN- β y IFN- γ , CXCL10, IL-4, IL-12 y IL-18, protrombina (dominio kringle 2), fragmento de antitrombina III, prolactina, VEGI, SPARC, osteopontina, maspina, canstatina, proteína relacionada con proliferina, restina y medicamentos similares por ejemplo, bevacizumab, itraconazol, carboxiamidotriazol, TNP-470, CM101, IFN- α , factor plaquetario 4, suramina, SU5416, trombospondina, antagonistas de VEGFR, esteroides angiostáticos + heparina, factor inhibidor de angiogénesis derivado de cartílago, inhibidores de metaloproteínasa de matriz, 2-metoxiestradiol, tecogalan, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina, inhibidores de prolactina α V β 3, linomida, tasquinimod. Para revisión, véase Schoenfeld y Dranoff 2011: Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin* (9): 976-81.

25 10. Fármacos de terapia dirigida de molécula pequeña

Los fármacos de terapia dirigida de molécula pequeña son generalmente inhibidores de dominios enzimáticos en proteínas mutadas, sobreexpresadas o bien críticas dentro de la célula cancerosa. Ejemplos prominentes y no limitantes son los inhibidores de la tirosina quinasa imatinib (Gleevec/Glivec) y gefitinib (Iressa). El uso de moléculas pequeñas, por ejemplo, el malato de sunitinib y/o el tosilato de sorafenib dirigidos a algunas quinasas en combinación con vacunas para la terapia del cáncer también se describen en la solicitud anterior de patente de los Estados Unidos No. 12/055.151 publicado como US2009/0004213, ahora patente de los Estados Unidos No. 9.308.244.

35 11. Vacunas basadas en virus

Hay una serie de vacunas contra el cáncer basadas en virus disponibles o en desarrollo que pueden usarse en un enfoque terapéutico combinado junto con las formulaciones de la presente divulgación.

Una ventaja del uso de tales vectores virales es su capacidad intrínseca para iniciar respuestas inmunes, con reacciones inflamatorias que se producen como resultado de la infección viral creando la señal de peligro necesaria para la activación inmune. Un vector viral ideal debe ser seguro y no debe introducir una respuesta inmune antivector para permitir reforzar respuestas específicas antitumorales. Los virus recombinantes como los virus vaccinia, los virus del herpes simple, los adenovirus, los virus adenoasociados, los retrovirus y los virus de la viruela aviar se han utilizado en modelos de tumores animales y, en base a sus resultados alentadores, se han iniciado ensayos clínicos en humanos. Las vacunas basadas en virus especialmente importantes son partículas similares a virus (VLP), pequeñas partículas que contienen ciertas proteínas de la capa externa de un virus. Las partículas similares a virus no contienen ningún material genético del virus y no pueden causar una infección, pero pueden construirse para presentar antígenos tumorales en su capa. Las VLP pueden derivarse de varios virus, tal como por ejemplo, el virus de la hepatitis B u otras familias de virus, incluidos Parvoviridae (por ejemplo, virus adenoasociados), Retroviridae (por ejemplo, VIH) y Flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C). Para una revisión general, véase Sorensen y Thompsen 2007: Virus-based immunotherapy of cancer: what do we know and where are we going? *APMIS* 115(11):1177-93; partículas similares a virus contra el cáncer se revisan en Buonaguro et al., 2011: Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Rev Vaccines* 10(11):1569-83; y en Guillén et al. 2010: Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants: application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. *Procedia in Vaccinology* 2 (2), 128-133.

55 12. Estrategias de múltiples epítomos

El uso de múltiples epítomos muestra resultados prometedores para la vacunación. Las tecnologías de secuenciación rápida combinadas con sistemas de algoritmos inteligentes permiten la explotación del mutanoma tumoral y pueden proporcionar múltiples epítomos para vacunas individualizadas que se pueden combinar con la presente invención. Para más información, véase 2007: Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. *J Immunother* 30: 762-772; además Castle et al. 2012: Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 72 (5):1081-91.

65 13. Transferencia adoptiva de células T

Por ejemplo, una combinación de una vacuna de antígeno tumoral y transferencia de células T se describe en:

Rapoport et al., 2011: Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood* 117(3): 788-97.

5 14. Terapias objetivo basadas en péptidos

Los péptidos pueden unirse a los receptores de la superficie celular o matriz extracelular afectada que rodea el tumor. Los radionúclidos que están unidos a estos péptidos (por ejemplo, RGD) eventualmente matan la célula cancerosa si el nucleído se descompone en las proximidades de la célula. Especialmente los oligómeros o multímeros de estos motivos de unión son de gran interés, ya que esto puede conducir a una mayor especificidad y avidéz del tumor. Para ejemplos no limitantes, véase Yamada 2011: Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. *Nihon Rinsho* 69(9): 1657-61.

15. Otras terapias

15 Existen numerosas otras terapias contra el cáncer que se pueden combinar con la presente invención para crear efectos sinérgicos. Ejemplos no limitantes son los tratamientos dirigidos a la apoptosis, hipertermia, terapia hormonal, terapia de telomerasa, terapia de potenciación de insulina, terapia génica y terapia fotodinámica.

20 Se pueden usar varios métodos conocidos en la técnica para detectar y/o determinar la cantidad de células que expresan CLDN6.

25 Por ejemplo, se puede usar un inmunoensayo para detectar la expresión de la proteína CLDN6 en las células o en la superficie celular. De acuerdo con la presente divulgación, los inmunoensayos incluyen, entre otros, transferencias de Western, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia, inmunoensayos de proteína A, citometría de flujo o análisis por FACS.

30 En un ejemplo, las células se unen con uno o más anticuerpos marcados que tienen la capacidad de unirse a CLDN6 antes de la detección y/o determinación de la cantidad.

35 Alternativamente, se puede detectar la expresión de ARNm de CLDN6 o se puede determinar la cantidad de ARNm de CLDN6 para detectar y/o determinar la cantidad de células que expresan CLDN6.

40 En ciertos ejemplos, una muestra obtenida de un paciente para detectar y/o determinar la cantidad de células que expresan CLDN6 es un fluido biológico, que incluye pero no se limita a sangre, médula ósea, suero, orina o fluido intersticial. En otros ejemplos, la muestra del paciente es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de un sujeto con o sospechoso de tener tejido canceroso). Lo más preferiblemente, la muestra es una biopsia de un tumor.

45 Una muestra puede ser una muestra biológica que ha sido sometida a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o determinación de la cantidad de células que expresan CLDN6. En cierto ejemplo, un fluido biológico se trata previamente mediante centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En otros ejemplos, una muestra de tejido se trata previamente mediante congelación, fijación química, inclusión en parafina, deshidratación, permeabilización u homogeneización, seguida de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis o cromatografía, o mediante una combinación de tales etapas de pretratamiento.

50 La cantidad de células madre cancerosas en una muestra se puede expresar como el porcentaje de, por ejemplo, células totales o células cancerosas totales en la muestra, o cuantificarse en relación con el área (por ejemplo, células por campo), volumen (por ejemplo, células por mL) o peso (por ejemplo, células por mL).

55 La cantidad de células madre cancerosas en una muestra de prueba se puede comparar con la cantidad de células madre cancerosas en (a) muestra o muestras de referencia. En un ejemplo, la muestra de referencia es una muestra obtenida del sujeto sometido a terapia en un punto de tiempo anterior (por ejemplo, antes de recibir la terapia como muestra de referencia de línea base, o en un punto de tiempo anterior mientras recibe la terapia). En este ejemplo, la terapia deseablemente da como resultado una disminución en la cantidad de células madre cancerosas en la muestra de prueba en comparación con la muestra de referencia. En otro ejemplo, la muestra de referencia se obtiene de un sujeto sano que no tiene cáncer detectable, o de un paciente que está en remisión por el mismo tipo de cáncer. En este ejemplo, la terapia deseablemente da como resultado que la muestra de prueba tenga una cantidad igual de células madre cancerosas, o menos que la cantidad de células madre cancerosas que se detectan en la muestra de referencia. En un ejemplo específico, una estabilización o reducción en la cantidad de células madre cancerosas en relación con una cantidad anterior (previamente detectada) de células madre cancerosas determinada para el sujeto indica una mejora en el pronóstico del sujeto o una respuesta positiva a la terapia, mientras que un aumento en relación con la cantidad anterior de células madre cancerosas indica un pronóstico igual o peor, y/o una falta de respuesta a la terapia.

En algunos ejemplos, una combinación de marcadores de superficie celular, por ejemplo, CLDN6 combinada con otros marcadores típicos de células madre cancerosas, se utiliza para determinar la cantidad de células madre cancerosas en la muestra.

5 Se divulga un kit que comprende uno o más recipientes llenos de reactivos para detectar, determinar la cantidad o controlar las células que expresan CLDN6. En un ejemplo, el kit opcionalmente comprende instrucciones para el uso de los reactivos para determinar las células madre cancerosas o controlar la eficacia de una terapia contra el cáncer mediante la detección y/o determinación de la cantidad de células que expresan CLDN6, en particular para el uso de los reactivos en los métodos de la invención. En un ejemplo, el kit comprende un agente que se une específicamente a la proteína CLDN6 o al ARNm de CLDN6. En algunos ejemplos, el agente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En otros ejemplos, el agente es un ácido nucleico. Para la detección de ácido nucleico, los kits generalmente comprenden (pero no se limitan a) sondas específicas para ARNm de CLDN6. Para la PCR cuantitativa, los kits generalmente comprenden cebadores preseleccionados específicos para secuencias de ácido nucleico de CLDN6. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender enzimas adecuadas para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, polimerasas tales como Taq) y desoxinucleótidos y tampones necesarios para la mezcla de reacción para la amplificación. Los kits de PCR cuantitativa también pueden comprender sondas específicas para secuencias de ácido nucleico de CLDN6. En algunos ejemplos, los kits de PCR cuantitativa también comprenden componentes adecuados para la transcripción inversa de ARN que incluyen enzimas (por ejemplo, transcriptasas inversas) y cebadores para la transcripción inversa junto con desoxinucleótidos y tampones necesarios para la reacción de transcripción inversa.

En ciertos ejemplos, el agente está marcado de forma detectable. Además, los kits pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo.

25 Con base en los resultados obtenidos (es decir, si las células madre cancerosas están presentes o si la cantidad de células madre cancerosas se ha estabilizado o disminuido), el médico puede elegir una terapia contra el cáncer particular, por ejemplo, una terapia contra el cáncer dirigida contra las células madre cancerosas, o puede optar por continuar la terapia. Alternativamente, en base al resultado de que no hay células madre cancerosas o que la cantidad de células madre cancerosas ha aumentado, el médico puede optar por administrar una terapia contra el cáncer no dirigida contra las células madre cancerosas o continuar, alterar o detener la terapia.

35 Si se determina que una reducción en la población de células madre cancerosas es inadecuada al comparar la población de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente sometido a la terapia contra el cáncer con la muestra del paciente tomada anteriormente del paciente, entonces un médico tiene varias opciones para ajustar la terapia. Por ejemplo, el médico puede aumentar la dosis de la terapia contra el cáncer, la frecuencia de administración, la duración de la administración o cualquier combinación de las mismas. En un ejemplo específico, una vez realizada la determinación, se puede administrar una terapia adicional contra el cáncer al paciente en lugar de la primera terapia o en combinación con la primera terapia.

40 En otros ciertos ejemplos, si se determina que la reducción en la población de células madre cancerosas es aceptable al comparar la población de células madre cancerosas en la muestra obtenida del paciente sometido a la terapia contra el cáncer con la muestra del paciente tomada anteriormente del paciente, entonces el médico puede optar por no ajustar la terapia contra el cáncer. Por ejemplo, el médico puede elegir no aumentar la dosis de la terapia contra el cáncer, la frecuencia de administración, la duración de la administración o cualquier combinación de las mismas. Además, el médico puede optar por agregar terapias adicionales o combinar terapias.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: CLDN6 se expresa en la superficie de células madre pluripotentes humanas inducidas

55 Para analizar si CLDN6 se expresa en células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC), se analizó la expresión de transcripción de *CLDN6* en HFF neonatal (fibroblastos de prepuccio humano, System Bioscience) en varios momentos del tratamiento con un cóctel de reprogramación (OSKMNL + EBK + mezcla de miR sin modificar; que consiste en el ARN transcrito *in vitro* (IVT) de OSKMNL = factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG y LIN28, ARN IVT de EBK = proteínas de *escape* de IFN E3, K3 y B18R y un mezcla de miARN que consiste en miR-302a/b/c/d y 367; de acuerdo con el protocolo descrito en el documento PCT/EP2012/04673 o imita los HFF transfectados (sin control de ARN) mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) utilizando un sistema y software de detección de secuencia ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems con el kit SYBR green QuantiTect (Qiagen)). Las células se cultivaron en medio sin suero Nutristem (Stemgent, Cambridge (MA)) suplementado con 10 ng/mL de bFGF y Tiazovivina 0,5 µM: el cóctel de reprogramación se transfectó utilizando Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) en los días 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 y 11 del experimento. Como control, las células se trataron solo con Lipofectamine RNAiMAX (sin control de ARN). Se detectó una clara sobreexpresión de casi 6000 veces de *CLDN6*

en comparación con el HFF sin tratar en el día 19 de tratamiento, y en el día 12 de tratamiento se observó una sobrerregulación de aproximadamente 2000 veces de *CLDN6* (Figura 1). Por lo tanto, *CLDN6* se expresa en células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC).

5 Se usó citometría de flujo para examinar si *CLDN6* también se expresa en la superficie de iPSC. A medida que las iPSC crecen en células alimentadoras de HFF, se combinó el análisis con la tinción para SSEA-4, un marcador de células madre bien aceptado, para garantizar que las iPSC se detecten específicamente. Para este propósito, las células de HFF tratadas con el cóctel de reprogramación o el simulacro de control (sin ARN) se recogieron en los días 5, 12 y 19 de tratamiento y se tiñeron con 1 µg/mL de IMAB027-AF647 específico para CLAB6 y 2 µL de anticuerpo SSEA-4 durante 30 minutos a 4 °C y la expresión superficial se analizó por citometría de flujo. También se incluyó el colorante de viabilidad 7-AAD en el protocolo de tinción para excluir las células muertas de los análisis. El experimento se realizó por duplicado y se registraron 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro de flujo BD Canto II. El análisis de las células registradas se realizó utilizando el software FlowJo y se muestran gráficos de puntos representativos (Figura 2).

15 En el día 5, *CLDN6* no es detectable en los HFF superficiales ni si se trataron con el cóctel de reprogramación o no. Inesperadamente, se encontró que SSEA-4 se expresa en el 15% de HFF, independientemente de si se trata con el cóctel de reprogramación o no. Esto podría explicarse por el hecho de que los HFF utilizados son fibroblastos neonatales y es posible que estas células conserven cierta positividad para SSEA-4. En el día 12 de tratamiento, aproximadamente el 63% de los HFF tratados son positivos para SSEA-4 y se observa una fracción doble positiva de *CLDN6*-SSEA-4 de aproximadamente el 15%. El día 19 de tratamiento, el 15% de los HFF tratados son positivos para *CLDN6* y SSEA-4, lo que representa una subpoblación distinta. Se supone que la subpoblación positiva para *CLDN6*-SSEA-4 marca la iPSC solo mientras que la subpoblación negativa para *CLDN6*-SSEA-4 se considera que es de células alimentadoras de HFF o células no reprogramadas y las células positivas solo para SSEA-4 representan células que están en el comienzo de la reprogramación.

20 Como se encontró el 15% de las células de HFF son positivas para SSEA-4 pero no para *CLDN6*, se supone que *CLDN6* representa un marcador más específico para iPSC humana que SSEA-4. SSEA-4 también se expresa en HFF neonatales, mientras que *CLDN6* parece expresarse específicamente solo en células de HFF totalmente reprogramadas que representan la fracción de iPSC.

Por lo tanto, *CLDN6* se expresa específicamente en la superficie de las iPSC humanas.

Ejemplo 2: *CLDN6* es importante para la formación de colonias de células de cáncer de ovario

35 Un ensayo potente para analizar propiedades similares a las CSC de células tumorales es el ensayo de formación de colonias. Usando este ensayo, se puede examinar fácilmente la capacidad de autorrenovación y la potencia de formación de tumores de células tumorales individuales. Para analizar si *CLDN6* juega un papel en la formación de tumores, se eligió por un lado COV318, una línea celular de tumor de ovario que muestra solo una subpoblación de células positivas para *CLDN6*, y por otro lado PA-1, una línea celular que expresa *CLDN6* de manera homogénea, que porta una inactivación de *CLDN6* mediada por ARN de horquilla pequeña (ARNph) lentiviral estable (clones PA-1 50, PA-1 54); véase la Figura 3.

45 Las células se tiñeron para *CLDN6* con 1 µg/mL de IMAB027-AF647 durante 30 minutos a 4 °C y luego se clasificaron por FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) usando un clasificador de células BD FACSAria con respecto a su expresión de *CLDN6*. 500 células (PA-1 50, PA-1 54) o 700 (COV318) de la subpoblación positiva para *CLDN6* o negativa para *CLDN6* se clasificaron directamente en los pozos de una placa de 6 pozos y se les permitió crecer hasta durante 14 días hasta que se formaron colonias suficientes. Dos veces a la semana, se cambió el medio de cultivo. Las colonias se tiñeron y fijaron con violeta cristal al 0,5% en etanol al 10% durante 20 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron secar al aire. Se tomaron fotografías y se contaron las colonias manualmente. Al menos 50 células se consideraron una colonia. En la Figura 4, se muestran ensayos representativos de líneas celulares de PA-1 50 y 54 inactivadas para COV318 y *CLDN6*.

50 Curiosamente, las células negativas para *CLDN6* muestran una formación de colonias significativamente menor en comparación con las células positivas para *CLDN6* en ambas líneas celulares. A partir de estos resultados, se concluye que *CLDN6* juega un papel importante en la capacidad de formación de colonias, que es una característica esencial de las células madre cancerosas.

Ejemplo 3: *CLDN6* se coexpresa con marcadores de CSC CD24, CD90 y CD44 en la línea celular de cáncer de ovario

60 El uso de perfiles de expresión de marcadores de superficie específicos es una estrategia común para la identificación y aislamiento de CSC de tumores sólidos y líneas celulares. Los marcadores de superficie utilizados en la literatura para el aislamiento de CSC de cánceres de ovario incluyen CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 y CD133. Para analizar si se pueden identificar subpoblaciones de CSC en líneas celulares de cáncer de ovario que contienen una pequeña subpoblación de células positivas para *CLDN6*, se configuró un panel de FACS que comprende anticuerpos contra estos marcadores de superficie (Tabla 1). Además, también se incluyó un anticuerpo para la detección de *CLDN6* en

el panel para investigar el porcentaje de colocalización de CLDN6 con los marcadores de CSC bien establecidos, juzgando así el potencial de CLDN6 para servir como marcador para CSC. Para este propósito, las células 1E6 de la línea celular COV318 se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con las cantidades indicadas de anticuerpos (véase Tabla 1) y las células se analizaron luego por citometría de flujo para su perfil de expresión de marcador de superficie. También se incluyó el colorante de viabilidad eFluor®506 en el protocolo de tinción para excluir las células muertas de estos análisis. El experimento se realizó por triplicado y se registraron 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro de flujo BD Canto II. El análisis de las células registradas se realizó utilizando el software FlowJo.

Tabla 1: panel de FACS de CSC. Se muestra el panel de FACS utilizado para el análisis del marcador de CSC y la expresión de CLDN6 en líneas celulares de cáncer de ovario. Se enumeran las cantidades de anticuerpos utilizados para los correspondientes marcadores y los fluorocromos acoplados.

Marcador de superficie	Cantidad de anticuerpo/Prueba	Fluorocromo del anticuerpo
CD44	5 mL/100 µL de prueba	FITC
CD133/1	2 mL/100 µL de prueba	PE
CD90	2,5 mL/100 µL de prueba	PerCP-Cy ^{MR} 5.5
CD117	1 mg/100 µL de Biotina de prueba 0,05 mg/100 µL de SA de prueba	APC-Cy7
CD34	5 µL/100 µL de prueba	Brilliant Violet ^{MR} 421
CD24	2 µL/100 µL de prueba	PE-Cy7
CLDN6	0,25 µL/100 µL de prueba	Alexa Fluor® 647
viva/muerta	0,2 µL/200 µL de PBS	Colorante de viabilidad fijable eFluor®506

Los análisis por FACS revelaron que las células COV318 expresan subpoblaciones del marcador de CSC CD44, CD90 y CD24 y que CLDN6 se colocaliza al menos en parte con los tres marcadores (Figura 5A). Luego, utilizamos diferentes estrategias de activación para calcular los porcentajes de colocalización de los cuatro marcadores. Primero, se calcula el porcentaje de células positivas para CD44, CD24, CD90 y CLDN6 en toda la población de células viables. Se encontró que el 0,18% de las células viables son positivas para los cuatro marcadores. A continuación, se calculó el porcentaje de células positivas para CD44, CD24 y CD90 en la población de células viables, lo que podría representar la fracción de CSC. Se encontró que el 0,23% de las células son positivas para los tres marcadores cuando se relacionan con toda la población de células viables, mientras que cuando se establece con relación a la subpoblación positiva para CLDN6, se encontró que una fracción del 20,1% de las células es triple positiva indicando una concentración de 87 veces de los tres marcadores en la subfracción positiva para CLDN6. En la última etapa, se calculó el porcentaje de células positivas para CLDN6, por un lado, en toda la población de células viables y, por otro lado, en la subpoblación positiva para CD44/CD24/CD90. Se encontró una concentración de células que expresan CLDN6 de 0,91% en la población total de células a 66,87% en la fracción de CSC, lo que indica un aumento de 74 veces (Figura 5B).

Juntos, estos datos muestran que CLDN6 se acumula en la fracción de CSC y viceversa, los marcadores de CSC se enriquecen en la subpoblación positiva para CLDN6. Estos hallazgos indican que CLDN6 es un marcador para CSC.

Ejemplo 4: El enriquecimiento de las células que expresan CLDN6 conduce a una acumulación de los marcadores de CSC establecidos CD44, CD24 y CD90

Se ha demostrado que las fracciones de CSC aisladas de líneas celulares y tumores a menudo se enriquecen para marcadores de CSC, tales como CD44 y CD24. Para analizar el potencial de CLDN6 para servir como un marcador novedoso para las CSC, se investigó si el aislamiento celular de las fracciones positivas para CLDN6 de las células en masa conduce a una acumulación de marcadores de CSC de ovario establecidos.

Para este propósito, las células COV318 se tiñeron con 0,5 µg/mL de IMAB027 durante 30 minutos a 4 °C seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG humano de cabra (1:300) durante 10 minutos a 4 °C y luego las fracciones de células positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6 se aislaron a partir de células COV318 mediante clasificación FACS usando un clasificador de células BD FACSAria. Las células seleccionadas se expandieron luego durante 10 días bajo condiciones de crecimiento estándar. Las células 1E6 de ambas subpoblaciones se tiñeron para los marcadores de CSC CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 y CD133 durante 30 minutos a 4 °C (para detalles véase la Tabla 1) y se analizaron por citometría de flujo para su perfil de expresión de marcador de superficie. Se registraron 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro de flujo BD Canto II y el análisis de las células registradas se realizó con el software FlowJo.

Los análisis por FACS mostraron que aproximadamente el 50% de las células de la fracción clasificada positiva para CLDN6 siguen siendo positivas para CLDN6 después del cultivo en condiciones estándar durante 10 días, mientras que las células clasificadas negativas para CLDN6 son completamente negativas para CLDN6. Es importante destacar que se encontró que la fracción positiva para CLDN6 mostró una acumulación de los marcadores de CSC CD44, CD24 y CD90 en comparación con la fracción de células negativas para CLDN6 de las células COV318. Los gráficos de puntos representativos de las diferentes muestras se muestran en la Figura 6A. La cuantificación adicional de los

niveles de expresión de estos marcadores reveló un enriquecimiento de CD44 de 99 veces, un enriquecimiento de CD90 de 8 veces y un enriquecimiento de CD24 de 33 veces cuando se compararon las subpoblaciones positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6 (Figura 6B).

5 Estos hallazgos demuestran que CLDN6 puede usarse como un marcador de selección para separar las fracciones de CSC de las líneas celulares en masa que indican que CLDN6 es un nuevo marcador de CSC.

Ejemplo 5: las líneas celulares de alta expresión de CLDN6 muestran un enriquecimiento de marcadores de CSC en comparación con las células de baja expresión de CLDN6

10 Se ha demostrado que CLDN6 se expresa altamente en tumores de células germinales, adenocarcinomas de ovario y algunos cánceres con fenotipo primitivo. En caso de que CLDN6 sea un marcador de CSC, se esperaría una acumulación de células con características similares a las de CSC en tales líneas celulares o tumores y, por lo tanto, una acumulación de células positivas para marcadores de CSC.

15 Se investigaron cuatro líneas celulares de alta expresión de CLDN6, las líneas celulares de carcinoma de ovario OV90 y PA-1 y las líneas celulares de carcinoma de testículo NEC-8 y NEC-14, por sus niveles de expresión de marcadores de CSC establecidos. Para este propósito, las células 1E6 de cada línea celular se tiñeron para los marcadores de superficie CD44, CD24, CD90, CD34, CD117 y CD133, así como para CLDN6 durante 30 minutos a 4 °C (para detalles, véase la Tabla 1) y las células se analizaron después mediante citometría de flujo para sus perfiles de expresión. Los experimentos se realizaron por triplicado y se registraron 50.000 eventos de cada muestra utilizando un citómetro de flujo BD Canto II y el análisis de las células registradas se realizó con el software FlowJo. Las células muertas se excluyeron del análisis por contratinción de células con el tinte de viabilidad eFluor®506. Los gráficos de puntos representativos de cada muestra se muestran en la Figura 7.

25 Los análisis por FACS revelaron que todas las líneas celulares investigadas son aproximadamente 95% positivas para CLDN6. Como se esperaba, estas líneas celulares de alta expresión de CLDN6 muestran además de CLDN6 también una acumulación de marcadores de CSC establecidos, con células OV90 que muestran una alta expresión de CD44, CD133, CD24 y CD117, células PA-1 que muestran una alta expresión de CD44, CD133, CD90 y CD117 y células NEC-8 y NEC-14 que muestran niveles de expresión elevados de los marcadores CD133, CD90, CD24 y CD117.

30 Estos hallazgos indican que las líneas de células de alta expresión de CLDN6 están enriquecidas para células similares a CSC y respaldan aún más que CLDN6 es un marcador de CSC.

35 Ejemplo 6: El tratamiento de tumores de xenoinjerto humano avanzados con una combinación de un anticuerpo CLDN6 y fármacos quimioterapéuticos inhibe el crecimiento de células tumorales y prolonga la supervivencia de manera sinérgica

40 Los ratones Hsd:Foxn1^{nu} desnudos atímicos fueron injertados con líneas celulares de cáncer humano. Una vez que los tumores se han establecido, los ratones portadores de tumores se agruparon y recibieron un anticuerpo monoclonal específico para CLDN6 (IMAB027), un fármaco quimioterapéutico o una combinación de ambos. El grupo de control recibió tampón de anticuerpos (control de vehículo).

45 Específicamente, para el tratamiento de tumores de xenoinjerto ES-2 (CLDN6) humano, la línea celular de carcinoma de ovario humano ES-2 transfectada establemente con CLDN6 humano se cultivó en medio esencial mínimo (Life Technologies) que contiene 1 x solución de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), 700 µg/mL de G418 (Life Technologies) y FCS al 10% (Life Technologies) a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:Foxn1^{nu} desnudos atímicos hembra de 6 semanas de edad con 5 x 10⁶ células ES-2 (CLDN6) en 200 µL de PBS en el costado. En el día 3 después de la inoculación tumoral subcutánea, los ratones se trataron con grupos de control de solución salina, anticuerpo o fármaco quimioterapéutico y terapia de combinación de anticuerpo/fármaco citostático (n = 12 por grupo). Se administraron 15 mg/kg de paclitaxel o un control salino los días 3, 10 y 17 después del injerto. El tratamiento de mantenimiento con anticuerpos comenzó el día 4 con tres veces a la semana 35 mg/kg de IMAB027 o inyecciones en bolo de control de vehículo (tampón IMAB027) (alternando iv/ip/ip). La carga tumoral y la salud animal se monitorearon dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen máximo de 1400 mm³ o cuando el tumor se volvió ulceroso. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de post-hoc de Dunn.

60 Para el tratamiento de tumores de xenoinjerto NEC 14 humanos avanzados, la línea celular de tumor de células germinales testiculares humanas NEC14 se cultivó de acuerdo con las instrucciones del proveedor en medio RPMI 1640 GlutaMAX^{MR} (Life Technologies) que contiene FCS al 10% (Life Technologies) a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:Foxn1^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad con 2 x 10⁷ células NEC14 en 200 µL de PBS en el costado. En el estudio de tratamiento avanzado, los tumores crecieron hasta un volumen entre 50 y 150 mm³ y los ratones se agruparon en grupos de control, monoterapia con anticuerpo o fármaco citostático y grupos de terapia de combinación de anticuerpo/fármaco citostático (n = 19 por grupo) antes del tratamiento. Seis días después del injerto, los

medicamentos solos o en combinación o un control de vehículo (solución salina) se administraron de la siguiente manera: 1 mg/kg de inyecciones ip en bolo de cisplatino los días 6, 7, 8, 9 y 10; 30 mg/kg de inyecciones ip de bolo de carboplatino en los días 6, 13 y 20 y tratamiento de mantenimiento con anticuerpo con tres veces a la semana 35 mg/kg de inyecciones en bolo de IMAB027 o un control de vehículo (tampón IMAB027) (alternando iv/ip/ip). La carga tumoral se monitorizó dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen máximo de 1400 mm³ o cuando el tumor se volvió ulceroso. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn.

En comparación con el grupo de control, el tratamiento de tumores de xenoinjerto de ES-2(CLDN6) humano que expresan ectópicamente CLDN6 humano con paclitaxel no es eficaz y no muestra actividad antitumoral. Por el contrario, IMAB027 inhibe el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia en ratones. El tratamiento con una combinación de IMAB027 y paclitaxel inhibe sinérgicamente el crecimiento tumoral (Figura 8).

Además, tanto el cisplatino como IMAB027 como agentes únicos pueden reducir significativamente el crecimiento tumoral en animales con tumor NEC14. Sin embargo, después de la inhibición inicial del crecimiento tumoral, se observó un crecimiento recurrente del tumor en la mayoría de los animales. En un enfoque de terapia combinada, el cisplatino y el IMAB027 actúan sinérgicamente y no solo inhiben el crecimiento tumoral, sino que evocan una remisión completa del tumor NEC14. Los datos de supervivencia muestran de manera más impresionante la eficacia terapéutica de IMAB027 en combinación con cisplatino. En comparación con los enfoques de agente único, casi todos los ratones tratados con IMAB027 junto con cisplatino todavía estaban vivos 90 días después del injerto del tumor (Figura 9).

En el tratamiento avanzado de ratones con tumores de xenoinjerto NEC14, otros derivados de platino tales como el carboplatino muestran solamente una eficacia antitumoral muy limitada. Sin embargo, la combinación de carboplatino con IMAB027 produce efectos inhibidores sinérgicos del tumor con una inhibición altamente eficiente del crecimiento tumoral y una prolongación de la supervivencia (Figura 10).

Por lo tanto, la combinación de un anticuerpo específico para CLDN6 con fármacos quimioterapéuticos aumenta la inhibición del crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia de ratones injertados con células tumorales humanas. La combinación del anticuerpo con fármacos quimioterapéuticos produce un efecto sinérgico con respecto a la inhibición del crecimiento de células tumorales y la prolongación de la supervivencia.

Ejemplo 7: CLDN6 es un marcador de CSC

Ejemplo 7.1: CLDN6 es importante para el comportamiento de formación de esferas de las células de cáncer de ovario

Otro ensayo potente para analizar propiedades similares a CSC de células tumorales es el ensayo de formación de esferas. Usando este ensayo, se puede examinar fácilmente la capacidad de las células para el crecimiento independiente del anclaje, una característica típica de las CSC. Para analizar si CLDN6 juega un papel en el crecimiento independiente del anclaje de las células tumorales, se eligieron las células COV318, la línea celular tumoral ovárica que solo contiene una subpoblación de células positivas para CLDN6. Las células COV318 se clasificaron de acuerdo con su expresión de CLDN6 y se permitió que las poblaciones de células positivas y negativas para CLDN6 formaran esferas durante 21 días en condiciones específicas de células madre. Los ensayos de formación de esferas revelaron que las células COV318 positivas para CLDN6 muestran la capacidad de formar esferas cuando se cultivan en condiciones específicas de células madre, mientras que las células negativas para CLDN6 casi mueren por completo (Figura 11A). Estos hallazgos indican que la fracción positiva de CLDN6 representa una población enriquecida con células madre, que muestra la capacidad de crecimiento independiente del anclaje.

Para definir la capacidad de las células COV318 positivas para CLDN6 de pasar por numerosos ciclos de división celular mientras se mantiene su estado indiferenciado, se analizó la capacidad de las esferas para producir esferas de segunda generación. Para este propósito, las esferas de primera generación de células COV318 positivas para CLDN6 (día 22 después de la siembra) se disociaron en células individuales y luego se volvieron a sembrar. Veintitrés días después de la resiembra, se pudo observar claramente que se ha formado una segunda generación de esferas y estas esferas recién formadas fueron morfológicamente más regulares que las esferas iniciales de primera generación (Figura 11B). Estas observaciones confirman además que la fracción positiva para CLDN6 de las células COV318 representa la fracción de células madre de esta línea celular.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran claramente que CLDN6 juega un papel sorprendente en el crecimiento independiente del anclaje de las células de cáncer de ovario, que es una característica esencial de las células madre cancerosas.

Ejemplo 7.2: Enriquecimiento de células COV318 positivas para CLDN6 después del tratamiento con fármacos quimioterapéuticos *in vitro*

La línea celular de cáncer de ovario COV318 muestra una expresión heterogénea de CLDN6 y una subpoblación muy pequeña de células (~ 0,3 - 0,5%) expresa CLDN6. El tratamiento de células COV318 con derivados de platino *in vitro* genera en cada caso una población celular residual con un mayor porcentaje (> 2%) de células positivas para CLDN6

(Figura 12). La acumulación específica de células positivas para CLDN6 después del tratamiento indica que estas células pueden tener una ventaja selectiva de supervivencia o crecimiento durante la quimioterapia. La resistencia a la quimioterapia convencional es una característica de las CSC.

5 Ejemplo 7.3: Enriquecimiento de células COV318 positivas para CLDN6 *in vivo*

En estudios anteriores, se encontró que las células COV318 inyectadas por vía subcutánea en el costado de ratones atímicos desnudos son débilmente tumorigénicas. Por el contrario, los ratones que recibieron células COV318 por inyección intraperitoneal desarrollaron ascitis maligna y tumores peritoneales en más de 100 días. A diferencia de las células COV318 parentales (Figura 13A), la mayoría de las células aisladas de ascitis y tumores fueron positivas para CLDN6 (Figura 13B, panel superior). Las células COV318 pierden la expresión de CLDN6 *in vitro* nuevamente después de haber sido cultivadas en condiciones estándar (Figura 13B, panel inferior). Esto significa que las células COV318 positivas para CLDN6 exhiben una mayor capacidad de formación de tumores, lo que sugiere que la pequeña subpoblación positiva para CLDN6 contiene CSC.

15 Ejemplo 7.4: CLDN6 se correlaciona con marcadores de células madre de cáncer de ovario en muestras de tumores primarios

Como los resultados anteriores mostraron que CLDN6 se colocaliza con algunos marcadores de CSC en líneas celulares de cáncer de ovario, luego se indagó si la expresión de CLDN6 también se correlaciona con marcadores de CSC en muestras de tumores primarios de pacientes con cáncer de ovario.

Para este propósito, la expresión de ARNm de CLDN6 y los marcadores seleccionados descritos en la literatura son específicos de células madre de cáncer en cáncer de ovario (CTCF, LIN28B, CD24, GNL3, EpCAM, CD44, ABCG2, ALDH1A1, AMACR, ATXN1, BMI1, BMP4, CD34, CD117, Myd88, Nanog, Notch 1, Pou5F1, CD133, Snail, Sox 2) se analizó en 42 muestras de cáncer de ovario humano mediante qRT-PCR. Se realizó un análisis de correlación posterior de CLDN6 con estos marcadores usando *r* de Spearman. Los gráficos de dispersión de correlaciones significativas, así como un resumen de todas las correlaciones se muestran en la Figura 14.

30 Se encontró una correlación positiva para CLDN6 con CTCFL, LIN28B, CD24, GNL3 y EPCAM, mientras que se encontró que CD44 se correlaciona negativamente con CLDN6 en las muestras analizadas de cáncer de ovario (Figura 14A). Para todos los otros marcadores investigados no se observó correlación significativa (Figura 14B).

Estos hallazgos respaldan aún más que CLDN6 es un marcador de CSC.

35 Ejemplo 8: La actividad antitumoral de los anticuerpos anti-CLDN6 se potencia mediante la combinación con fármacos quimioterapéuticos

40 Ejemplo 8.1: Influencia de agentes quimioterapéuticos en ADCC mediada por IMAB027

La influencia de los agentes quimioterapéuticos en la ADCC mediada por IMAB027 se analizó con células COV362 (Luc), que se trataron previamente con carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, doxorubicina y topotecano, respectivamente. El pretratamiento de las células objetivo da como resultado un aumento en los niveles de proteína de CLDN6 en la superficie celular, tal como se muestra por citometría de flujo (Figuras 15B, D, F, H y J). En comparación con las células objetivo no tratadas, la lisis máxima de las células tratadas con compuestos quimioterapéuticos se incrementa hasta 3 veces (Figuras 15A, C, F, G e I). En resumen, la actividad antitumoral de IMAB027 puede potenciarse en combinación con fármacos quimioterapéuticos.

50 Ejemplo 8.2: La combinación de quimioterapia múltiple con PEB (cisplatino, etopósido y bleomicina) con IMAB027 aumenta de manera muy efectiva la inhibición del crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia de los ratones injertados con la línea celular tumoral humana NEC14

[Los ratones Hsd: *Foxn1^{nu}* desnudos atímicos se injertaron en forma subcutánea con la línea celular de tumor de células germinales testiculares humanas NEC14. Los ratones con tumores muy avanzados se asignaron al azar y se trataron con el anticuerpo IMAB027, la quimioterapia múltiple con PEB (cisplatino, etopósido y bleomicina) o una combinación de IMAB027 y PEB.

En comparación con los ratones no tratados y tratados con IMAB027, la quimioterapia múltiple reduce significativamente el crecimiento tumoral (Figura 16A). Sin embargo, después de que los tumores respondieron inicialmente al tratamiento con PEB, comenzaron a crecer en la mayoría de los animales en el día 30. Una inhibición sostenible del crecimiento tumoral solo se logró en un enfoque combinado en el que PEB e IMAB027 actúan sinérgicamente juntos (Figura 16B). Los ratones no tratados mostraron una supervivencia media de 30 días, mientras que se observaron supervivencias medias de 34 y 97 días en ratones tratados con IMAB027 y PEB, respectivamente. En el grupo tratado con PEB, 3/14 (21%) de los ratones mostraron remisión tumoral completa y 1/14 (7%) de los ratones presentaron una masa tumoral residual de ~30 mm³ al final del estudio. Sorprendentemente, se observó regresión tumoral completa en 12/14 (86%) ratones tratados con PEB en combinación con IMAB027. Se curaron 11

ratones sin ninguna recaída durante más de 6 meses y se sacrificó un ratón sin tumor el día 93 debido a malas condiciones generales de salud (Figura 16C). El estudio mostró que los animales con tumores testiculares NEC14 humanos muy avanzados que recibieron PEB en combinación con IMAB027 tuvieron una supervivencia significativamente más larga y una tasa de respuesta significativamente mayor en comparación con los animales tratados con la quimioterapia múltiple sola.

Ejemplo 9: Los conjugados de anticuerpo anti-CLDN6-fármaco son altamente efectivos en el tratamiento de tumores que expresan CLDN6

Ejemplo 9.1: Unión y actividad antitumoral de IMAB027 conjugado con toxina *in vitro*

Las afinidades de unión relativa de los conjugados de IMAB027-fármaco IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE se probaron en la línea celular de cáncer de ovario OV90 usando citometría de flujo. En el experimento de unión de saturación, la concentración de los anticuerpos se graficó contra la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) y la EC50 (concentración de anticuerpo que se une a la mitad de los sitios de unión en equilibrio) y la unión máxima se calculó por regresión no lineal. En comparación con IMAB027 no conjugado, ambos conjugados de IMAB027-fármaco exhibieron valores bajos de EC50 similares y se logró la saturación de unión a bajas concentraciones (Figura 17A). Las actividades citotóxicas de los conjugados de IMAB027-fármaco se determinaron con células OV90 usando el ensayo de proliferación XTT. Las curvas de dosis-respuesta muestran una inhibición similar del crecimiento de células tumorales para IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE *in vitro* (Figura 17B). En resumen, IMAB027 conjugado con DM1 o vcMMAE se une con afinidades relativas similares a las células objetivo positivas para CLDN6 que inducen de manera altamente eficiente la muerte de células tumorales.

Ejemplo 9.2: El tratamiento de tumores de xenoinjerto humano avanzado con un anticuerpo anti-CLDN6 IMAB027 conjugado con toxina inhibe el crecimiento de células tumorales, prolonga la supervivencia y media la regresión tumoral completa

La actividad antitumoral del anticuerpo IMAB027 específico de CLDN6 conjugado con un fármaco citotóxico se probó en ratones que se injertaron con líneas celulares de carcinoma humano positivas para CLDN6. En este enfoque dirigido, IMAB027 se unió al maitansinoide DM1 o la auristatina E (MMAE) y se controló el crecimiento tumoral en ratones *Foxn1^{nu}* desnudos atímicos con tumores de xenoinjerto avanzados.

Tratamiento de un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de ovario OV90 humano avanzado:

El efecto antitumoral de IMAB027 conjugado con toxina se probó en ratones con tumores de xenoinjerto humano avanzado con expresión homogénea de CLDN6. El tratamiento se inició el día 10 después del injerto de células tumorales. Después de una sola inyección en bolo iv, IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE inhibieron altamente el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células de carcinoma de ovario OV90 que expresan CLDN6 de manera homogénea (Figuras 18 y 19A). Más importante aún, la aplicación única de 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE resultó en la remisión completa del tumor en el 60% de los ratones tratados (Figura 19B).

Tratamiento de un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de ovario humano PA-1 avanzado:

El efecto antitumoral de IMAB027 conjugado con toxina también se probó en un modelo de tumor de xenoinjerto avanzado con expresión heterogénea de CLDN6. Después del injerto subcutáneo, los tumores de xenoinjerto de PA-1 pierden la expresión de CLDN6 después de un cierto período de tiempo (Figura 20C). El tratamiento se inició el día 15. En ese momento, los tumores de xenoinjerto de PA-1 comienzan a perder la expresión de CLDN6. Los animales recibieron 4, 8 o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE mediante una sola inyección en bolo iv. Los animales de control recibieron IMAB027 no conjugado o tampón de control de vehículo en su lugar.

El tratamiento con IMAB027-vcMMAE inhibió altamente significativamente el crecimiento tumoral de xenoinjertos de PA-1 y la supervivencia prolongada de ratones portadores de tumor, mientras que IMAB027 o IMAB027-DM1 (datos no mostrados) no afectaron el crecimiento tumoral de PA-1 (Figura 20A y B).

El nivel reducido de células tumorales positivas para CLDN6 en la masa tumoral es probablemente responsable de la débil actividad antitumoral de IMAB027 e IMAB027-DM1 en este modelo de tumor *in vivo*. IMAB027-DM1 se conjuga a través de un enlazador no escindible a la toxina no permeable a la membrana DM1. Por el contrario, IMAB027-vcMMAE se conjuga con la toxina permeable a la membrana celular MMAE a través de un enlazador escindible por catepsina. La liberación de formas de MMAE permeables a la membrana después del procesamiento celular facilita la destrucción de las células tumorales que carecen del epítipo particular (efecto de espectador). Por lo tanto, el tratamiento con IMAB027-vcMMAE es altamente efectivo en la erradicación de tumores de PA-1 que contienen células positivas para CLDN6 y negativas para CLDN6.

En resumen, IMAB027-vcMMAE es altamente eficiente para destruir tumores de xenoinjerto humano con expresión heterogénea de CLDN6 mediante la destrucción activada por células objetivo de células espectadoras.

Tratamiento de un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo gástrico MKN74 humano avanzado:

A diferencia de los tumores de xenoinjerto de PA-1 que pierden la expresión de CLDN6 en tumores avanzados, los tumores de xenoinjerto de MKN74 obtienen la expresión de CLDN6. Como se muestra por citometría de flujo usando el anticuerpo específico para CLDN6 IMAB027 <0,3% de las células de la línea celular de cáncer gástrico MKN74 son positivas para CLDN6 *in vitro*. Curiosamente, un número considerable de células tumorales exhibe expresión de CLDN6 después del injerto subcutáneo en ratones atímicos desnudos (Figura 21C). Los tratamientos de tumores de xenoinjerto MKN74 establecidos con 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE dieron como resultado una inhibición altamente significativa del crecimiento tumoral y prolongaron la supervivencia (Figuras 21A y B).

La inhibición del crecimiento tumoral observada con IMAB027-vcMMAE puede ser causada por la destrucción activada por células objetivo de células espectadoras.

Tratamiento de un modelo de tumor de xenoinjerto intraperitoneal de ovario PA-1 humano avanzado:

Además del tratamiento de tumores de xenoinjerto sc, los anticuerpos IMAB027 conjugados con toxina también se analizaron para determinar su actividad antitumoral en un modelo de tumor de xenoinjerto ip que usa células PA-1 que expresan ectópicamente luciferasa para control *in vivo* (Figura 22). Los ratones recibieron 16 mg/kg de IMAB027-DM1 o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE mediante una sola inyección iv en bolo el día 14 después del injerto de células tumorales.

La medición de las intensidades de bioluminiscencia *in vivo* reveló un crecimiento tumoral inhibido de metástasis peritoneales de PA-1 después del tratamiento con IMAB027-DM1. Además, IMAB027-vcMMAE mostró un efecto antitumoral significativamente mayor que IMAB027-DM1 o vehículo con regresión completa de tumores peritoneales en el 100% de los animales (Figura 22).

En resumen, IMAB027-vcMMAE e IMAB027-DM1 son altamente efectivos sin mostrar efectos secundarios tóxicos en el intervalo de concentración probado *in vivo*. IMAB027-DM1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral de los tumores de xenoinjerto subcutáneo y disminuyó el crecimiento tumoral de los tumores de xenoinjerto peritoneal. IMAB027-vcMMAE inhibió significativamente el crecimiento tumoral y la supervivencia prolongada de animales con tumores de xenoinjerto humano subcutáneo o peritoneal con expresión de CLDN6 homogénea o incluso heterogénea. Lo más impresionante es que una gran parte de los animales portadores de tumores se curaron después del tratamiento con el anticuerpo conjugado con MMAE. La destacada actividad antitumoral de IMAB027-vcMMAE, especialmente observada en animales cuyos tumores exhibieron una expresión heterogénea de CLDN6, demuestra que los conjugados de IMAB027-vcMMAE son adecuados para tratar tumores con un bajo porcentaje de positividad de CLDN6.

Ejemplo 9.3: La endocitosis de anticuerpos específicos para CLDN6 depende de su afinidad y del epítipo de unión a CLDN6

La eficacia citotóxica de los anticuerpos conjugados con toxina depende estrictamente de su potencial de internalización mediado por el objetivo. Por lo tanto, la generación de anticuerpos con altas tasas de endocitosis es el factor clave esencial en el desarrollo de anticuerpos conjugados con toxinas.

La eficacia de la endocitosis se probó *in vitro* incubando endógenamente células de carcinoma humano que expresan CLDN6 junto con anticuerpos quiméricos monoclonales reactivos a CLDN6 y fragmentos Fab antihumanos que se conjugan con la toxina saporina. La internalización de los complejos de anticuerpo unido a CLDN6/Fab-saporina da como resultado la destrucción específica de las células y puede medirse usando un ensayo de viabilidad celular. La detección de diferentes anticuerpos reactivos con CLDN6 demuestra que la endocitosis no solo depende de la afinidad de unión de un anticuerpo sino también del epítipo antigénico. Se observó que la unión de anticuerpos específicos de CLDN6 a un epítipo en el primer bucle extracelular de CLDN6 apoya la endocitosis en las células de carcinoma humano OV-90 y PA-1. Cabe destacar que el anticuerpo 5F2D2 reactivo a CLDN6 que se une con una afinidad similar o superior pero a otro epítipo muestra un potencial citotóxico menor en este ensayo (Figura 23).

Ejemplo 10: Materiales y métodos utilizados en los ejemplos anteriores 7 a 9

Cultivo de células:

Las células COV362(Luc) y PA-1(Luc) que expresan establemente un gen indicador luminiscente se generaron mediante transfección estable de las líneas celulares COV362 (ECACC, 07071910) y PA-1 (ATCC, CRL-1572) con luciferasa de luciérnaga, respectivamente.

Las células NEC14 (JCRB, 0162) y MKN74 (JCRB, 0255) se cultivaron en medio RPMI1640 (Gibco, 61870-010) suplementado con FCS al 10% inactivado por calor (Gibco, 10270-106). Las células COV318 (ECACC, 07071903) y COV362(Luc) se cultivaron en DMEM (Gibco, 41965-039) que contenía GlutaMAX 2 mM (Gibco, 35050-038) y FCS al 10% inactivado por calor. Las células PA-1 y PA-1(Luc) se cultivaron en MEM (Gibco, 31095-029) suplementado con

1,5 g/L de bicarbonato de sodio (Invitrogen, 25080), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen, 11360), aminoácidos no esenciales al 1% (Gibco, 11140-035) y FCS al 10% inactivado por calor. Las células OV90 (ATCC, CRL-11732) se cultivaron en una mezcla 1:1 de MCB105 (Sigma, M6395) y medio 199 (Sigma, M4530) suplementado con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y FCS al 15% inactivado por calor. Las células se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂.

5 Determinación de la expresión de CLDN6 por citometría de flujo:

Las células se cosecharon con tripsina/EDTA al 0,05% (Gibco, 25300-054), se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% (Gibco, 10270-106) y azida de sodio al 0,1% (Applichem, A1430) y se resuspendieron en tampón de FACS a una concentración de 2 x 10⁶ células/mL. Se incubaron 100 µL de la suspensión celular con el anticuerpo anti-CLDN6 IMAB027 o un anticuerpo IgG1 humano de control de isotipo (Sigma, I5154) a una concentración de 2,5 µg/mL durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron con una IgG anti-humana de cabra del fragmento F(ab')₂ conjugado con APC (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170) diluido 1: 200 en tampón de FACS durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en tampón de FACS. La unión se analizó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAarray (BD Biosciences) y el software FlowJo (Tree Star Inc.). Se usó yoduro de propidio como colorante para vivas/muertas (Sigma, P4864) para excluir las células muertas del análisis.

20 Tratamiento de células COV318 con derivados de platino:

Se cultivaron células COV318 (1,2 x 10⁶ células por placa de cultivo celular de 100 mm) en condiciones estándar. Después de 24 h, las células se trataron con 0,5 µg/mL de cisplatino o 2 µg/mL de carboplatino y se incubaron durante 96 h. Se cambió el medio y se cultivaron las células tratadas en condiciones de crecimiento estándar. Después de 3 y 6 días, las células se analizaron para la expresión de CLDN6 por citometría de flujo.

25 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) después del tratamiento con agentes citostáticos:

La línea celular de carcinoma de ovario humano COV362 transfectada establemente con luciferasa como indicador se usó para determinar la influencia de carboplatino y paclitaxel en ADCC mediada por IMAB027. Se cultivaron células COV362(Luc) (3 x 10⁶ células por placa de cultivo celular de 150 mm) en condiciones estándar. Después de 24 h, las células se trataron con 5 ng/mL de paclitaxel, 20 µg/mL de carboplatino, 25 ng/mL de gemcitabina, 20 ng/mL de doxorubicina o 7,5 ng/mL de topotecano y se incubaron durante 4 días. El medio se cambió y las células tratadas se cultivaron en condiciones de crecimiento estándar durante 3 días más para carboplatino y gemcitabina o 10 días para paclitaxel, doxorubicina o topotecano.

35 Las células se cosecharon con tripsina/EDTA al 0,05% (Gibco, 25300-054) y se ajustaron a una concentración de 2 x 10⁵ células/mL en DMEM que contenía glutamina 2 mM (Gibco, 25030-081) y HEPES 20 mM (Gibco, 15630-056). Se sembraron 1 x 10⁴ células por pozo en una placa de PP blanca de 96 pozos y se incubaron durante ~5 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

40 Se aislaron PBMC (células mononucleadas de sangre periférica) de muestras de sangre de donantes humanos mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll Hypaque (GE Healthcare, 17144003). La interfase que contenía PBMC se aisló y las células se lavaron tres veces con PBS que contenía EDTA 2 mM. Las PBMC se resuspendieron en medio X-Vivo 15 (Lonza, BE04-418Q) a una concentración de 1,6 x 10⁷ células/mL y se almacenaron a 37 °C y 5% de CO₂ hasta el ensayo.

45 Se añadieron 25 µL de IMAB027 y anticuerpo de control de isotipo a las células a las concentraciones indicadas. Después de eso, se añadieron 25 µL de la suspensión de PBMC y las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

50 Después de agregar 10 µL de Triton X-100 al 8% (Sigma, T8787) en PBS a los controles de *lisis total* y 10 µL de PBS a los controles de *células viables máximas* y a las muestras, se agregaron 50 µL de mezcla de luciferina (3,84 mg/mL D-luciferina (Sigma Aldrich, 50227) y HEPES 160 mM en ddH₂O) y las células se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 90 minutos. La bioluminiscencia se midió utilizando un luminómetro (Infinite M200, TECAN). Los resultados se presentan como unidades de luz relativas digitales integradas.

La lisis específica se calcula como:

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

60 células viables máx.: 10 µL de PBS, sin anticuerpo
lisis total: 10 µL de Triton X-100 al 8% en PBS, sin anticuerpo

Injerto intraperitoneal de células COV318 en ratones desnudos atímicos:

La tumorigenicidad *in vivo* de la línea celular de carcinoma de ovario humano COV318 y la acumulación de células positivas para CLDN6 se probaron en ratones. Por lo tanto, se inyectaron 2×10^7 células COV318 resuspendidas en PBS por vía intraperitoneal en ratones Hsd:*Foxn1*^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad. Los ratones fueron controlados en forma diaria. Una vez que los síntomas potencialmente mortales se manifestaron notablemente, el animal fue sacrificado. Las células tumorales y ascíticas fueron aisladas y cultivadas para su posterior análisis. Los tumores se disociaron mecánicamente, se pasaron a través de una malla y se lavaron con medio DMEM (Gibco, 41965-039). Para obtener una suspensión de células individuales, las células tumorales se trataron con accutasa (Life Technologies, A11105-01) durante 30 minutos a 37 °C, se pasaron a través de un filtro de células de 40 µm y se lavaron con medio DMEM. Se recogió ascitis y se eliminaron los glóbulos rojos contaminantes utilizando tampón de lisis ACK (cloruro de amonio y potasio) (Invitrogen, A10492-01). Se cultivaron células tumorales y ascíticas en condiciones estándar usando medio COV318 estándar suplementado con penicilina/estreptomina (Gibco, 15140). Las células se seleccionaron para la expresión de CLDN6 por citometría de flujo.

15 Tratamiento de tumores de xenoinjerto NEC14 humanos muy avanzados:

Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:*Foxn1*^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad con 2×10^7 células NEC14 en 200 µL de PBS en el costado. En el estudio de tratamiento muy avanzado, los tumores se cultivaron durante 13 días hasta un volumen máximo de 170 mm³ y los ratones se agruparon en grupos de control, IMAB027, PEB (cisplatino, etopósido, bleomicina) e IMAB027/PEB (n = 14 por grupo) antes del tratamiento.

Trece días después del injerto, los fármacos se administraron de la siguiente manera: 1 mg/kg de inyecciones ip en bolo de cisplatino los días 13, 14, 15, 16 y 17; 5 mg/kg de inyecciones ip en bolo de etopósido los días 13, 14, 15, 16 y 17; 10 mg/kg de inyecciones ip en bolo de bleomicina en los días 13, 17 y 21. IMAB027 se aplicó tres veces por semana desde el día 13 hasta el día 101 mediante inyecciones alternando iv/ip/ip en bolo de 35 mg/kg IMAB027. Como controles del vehículo, los ratones recibieron tampón de la sustancia farmacológica en lugar de anticuerpo o solución de NaCl al 0,9% en lugar de PEB, respectivamente.

La carga tumoral y la salud animal se monitorizaron dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen de 1400 mm³ o cuando el tumor se volvió ulceroso. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn.

Ensayo de formación de esferas:

Para el ensayo de formación de esferas, las células COV318 se tiñeron para CLDN6 con 0,5 µg/mL de IMAB027 durante 30 minutos a 4 °C seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG humano de cabra (1:300) durante 10 minutos a 4 °C y las células se clasificaron posteriormente con respecto a su expresión de CLDN6 usando un clasificador de células BD FACSAria. Se sembraron 1×10^6 células clasificadas positivas para CLDN6 o negativas para CLDN6 en pozos de una placa de fijación ultra baja de 6 pozos (Corning) en medio DMEM/F12 sin suero que contenía albúmina de suero bovino al 0,4%, 20 ng/mL del factor de crecimiento de fibroblastos básico, 10 ng/mL del factor de crecimiento epidérmico y 5 µg/mL de insulina y se permitió que las células formaran esferas durante 21 días bajo estas condiciones específicas de células madre. El medio se intercambiaba cada dos días sin perturbar las esferas y se tomaron fotografías representativas con regularidad.

Para la producción de esferas de segunda generación, las esferas de primera generación de células COV318 positivas para CLDN6 (día 22 después de la siembra) se disociaron en células individuales y luego se volvieron a sembrar en pozos de placas de fijación ultra baja de 6 pozos. Nuevamente, el medio se intercambiaba cada dos días sin perturbar las esferas formadas y se tomaron fotografías representativas con regularidad.

50 Análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real utilizando un sistema BioMark^{MR} HD (Fluidigm):

Se analizaron 42 muestras de cáncer de ovario humano mediante qRT-PCR con ensayos de expresión génica TaqMan® (Life Technologies) para factores específicos de células madre de cáncer de ovario seleccionados (CTCF, LIN28B, CD24, GNL3, EpCAM, CD44, ABCG2, ALDH1A1, AMACR, ATXN1, BMI1, BMP4, CD34, CD117, Myd88, Nanog, Notch 1, Pou5F1, CD133, Snail, Sox 2) utilizando un sistema BioMark^{MR} HD (Fluidigm). El aislamiento de ARN a partir de muestras de cáncer de ovario se realizó con el mini kit RNeasy (Qiagen) y se sintetizó el ADNc usando el kit de reactivos PrimeScript RT (Takara Bio Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo. Las muestras se prepararon y analizaron de acuerdo con el protocolo 28 de desarrollo avanzado Fluidigm®, análisis rápido de expresión génica utilizando los ensayos TaqMan® GE rev A2. La carga en 96,96 IFC de matriz dinámica de expresión génica se logró mediante el controlador HX de IFC. Los arreglos de chips se analizaron mediante un sistema Fluidigm BioMark^{MR} HD. La mezcla maestra TaqMan PreAmp se adquirió de Applied Biosystems. Los conjuntos de datos se evaluaron de acuerdo con el método $\Delta\Delta Ct$. El análisis de correlación de CLDN6 con los marcadores seleccionados de células madre de cáncer de ovario se realizó utilizando r de Spearman. La significancia de los valores de correlación se evaluó mediante una prueba sobre los coeficientes de correlación. Los valores p se ajustaron para múltiples pruebas utilizando el método de Benjamini y Hochberg, y los valores p ajustados $\leq 0,05$ se consideraron significativos.

Conjugación con toxina del anticuerpo CLDN6

Las conjugaciones con toxinas de los anticuerpos monoclonales se realizaron con Piramal Healthcare (Grangemouth, Reino Unido).

Para la conjugación con DM1, los anticuerpos desnudos se modificaron con SMCC (molaridad 6x) que reacciona con los residuos de NH₂ libres de grupos lisina por incubación en PBS (pH 7,2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los anticuerpos modificados se dializaron en tampón de citrato 35 mM (pH 5,0) y se determinó la relación de enlace con el anticuerpo usando el ensayo de Ellman inverso. DM1 (molaridad 6x) se conjugó a través de su grupo sulfhidrilo con la fracción de maleimida del enlazador de SMCC por incubación durante 17 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos conjugados se dializaron en tampón de formulación (His 20 mM, 85 mg/mL de sacarosa, pH 5,8) y se almacenaron a -80 °C. La relación de fármaco-anticuerpo se analizó por espectrometría UV, el contenido de monómero por SEC-HPLC y el contenido de fármaco libre por RP-HPLC.

Para la conjugación con MMAE, los anticuerpos desnudos se dializaron en PBS (pH 7,2) y se modificaron mediante tiolación de los grupos NH₂ libres de residuos de lisina usando el reactivo de Traut (2-Iminotiolano) (molaridad 20x) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los anticuerpos tiolados se dializaron en tampón de citrato 35 mM (pH 5,5) y se determinó la relación de enlace a anticuerpo usando el ensayo inverso de Ellman. Se conjugó vcMMAE (molaridad 6x) a través de la valina del enlazador escindible por cathepsina con el grupo sulfhidrilo de los anticuerpos tiolados por incubación durante 15 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos conjugados se dializaron en tampón de formulación (His 20 mM, 85 mg/mL de sacarosa, pH 5,8) y se almacenaron a -80 °C. La relación de fármaco-anticuerpo se analizó por espectrometría UV, el contenido de monómero por SEC-HPLC y el contenido de fármaco libre por RP-HPLC.

Determinación de las afinidades de unión relativas por citometría de flujo:

Las células se cosecharon con tripsina/EDTA al 0,05% (Gibco, 25300-054), se lavaron con tampón de FACS (PBS que contenía FCS al 2% (Gibco, 10270-106) y azida de sodio al 0,1% (Applichem, A1430) y se resuspendieron en tampón de FACS a una concentración de 2×10^6 células/mL. Se incubaron 100 µL de la suspensión celular durante 30 minutos a 4 °C con IMAB027, IMAB027-DM1 o IMAB027-vcMMAE (series de valoración desde 0,1 ng/mL hasta 20 µg/mL). Las células se lavaron tres veces con tampón de FACS y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con IgG antihumana (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170) diluidas 1:200 en tampón de FACS. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en 100 µL de tampón de FACS. La unión se analizó mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSAarray (BD Biosciences) y el software FlowJo (Tree Star Inc.).

Ensayo de viabilidad con IMAB027 conjugado con toxina:

El efecto de IMAB027-DM1 e IMAB027-vcMMAE sobre la viabilidad de líneas celulares tumorales humanas se determinó *in vitro* usando un ensayo colorimétrico que detecta actividades metabólicas celulares (kit de proliferación celular XTT de AppliChem).

Las células OV90 se cosecharon con 0,05% de tripsina/EDTA (Gibco, 25300-054) y se sembraron 2500 células en 50 µL de medio de crecimiento en un cultivo de 96 pozos. Después de 24 horas, se agregaron series de concentración de IMAB027 conjugado con DM1 y MMAE o un anticuerpo de control de isotipo diluido en 50 µL de medio. Las células se cultivaron durante 3 a 7 días hasta que las células no tratadas alcanzaron una confluencia de ~ 80%. La viabilidad celular se analizó utilizando el Kit de proliferación celular AppliChem II (AppliChem, A8088-1000) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 3-5 horas de incubación con reactivo XTT, se transfirieron 100 µL de los sobrenadantes celulares a una nueva placa de ensayo de 96 pozos y se midió la absorbancia a 480 nm (referencia 630 nm) usando un espectrofotómetro (Tecan). La viabilidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{reducción de viabilidad [\%]} = 100 - \left[\frac{(\text{muestra} - \text{blanco})}{(\text{células viables máx.} - \text{blanco})} \times 100 \right]$$

blanco: medio y XTT sin células

células viables máx.: células, medio y XTT

Los valores de EC50 se determinaron usando el software GraphPad Prism 6 mediante regresión no lineal.

Tratamiento de tumores de xenoinjerto de OV90 subcutáneo avanzado:

La línea celular de carcinoma de ovario humano OV90 se cultivó en condiciones estándar. Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:Foxn1^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad con 1×10^7 células OV90 en 200 µL de PBS en el costado. En el estudio de tratamiento avanzado, los tumores se cultivaron durante 10 días y los ratones con tumores establecidos de 50-150 mm³ de volumen se asignaron al azar en grupos de vehículo y

anticuerpo (n = 10) antes del tratamiento. El volumen del tumor ($VT = (\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$) se controló cada dos semanas. El VT se expresa en mm^3 , lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

5 En el estudio de búsqueda de intervalo de dosis inicial, los animales fueron inyectados una vez iv con vehículo, IMAB027-DM1 (1,78 mg/kg, 5,33 mg/kg o 16 mg/kg) y se diseccionaron el día 35 después del injerto. En un segundo estudio de búsqueda de intervalo de dosis, los animales fueron inyectados una vez iv con vehículo, IMAB027-vcMMAE (4 mg/kg, 8 mg/kg o 16 mg/kg) o IMAB027-DM1 (1,33 mg/kg, 2,67 mg/kg o 5,33 mg/kg). IMAB027 se aplicó tres veces por semana mediante inyecciones alternantes iv/ip/ip en bolo de 35 mg/kg de IMAB027. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a 1400 mm^3 o se ulceraron. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn. La supervivencia se analizó mediante la prueba de Mantel Cox.

Tratamiento de tumores de xenoinjerto de PA-1 subcutáneo avanzado e inmunohistoquímica de secciones tumorales:

15 La línea celular de carcinoma de ovario humano PA-1 se cultivó bajo condiciones estándar. Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:*Foxn1*^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad con 1×10^7 células PA-1 en 200 μL de PBS en el costado. En el estudio de tratamiento avanzado, los tumores se cultivaron durante 15 días y los ratones con tumores establecidos de 40-120 mm^3 de volumen se asignaron al azar al grupo de vehículo y anticuerpo (n = 10) antes del tratamiento. El volumen del tumor ($VT = (\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$) se controló cada dos semanas. EL VT se expresa en mm^3 , lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

20 Los animales fueron inyectados una vez iv con vehículo, IMAB027-vcMMAE (4 mg/kg, 8 mg/kg o 16 mg/kg) o IMAB027-DM1 (4 mg/kg, 8 mg/kg o 16 mg/kg). IMAB027 se aplicó tres veces por semana mediante inyecciones alternantes iv/ip/ip en bolo de 35 mg/kg de IMAB027. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor a 1400 mm^3 o se ulceraron. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn. La supervivencia se analizó mediante la prueba de Mantel Cox.

30 Para analizar la expresión de CLDN6 durante el establecimiento y progresión del tumor, se diseccionaron tumores PA-1 de ratones no tratados en los días 7, 14 y 56, respectivamente, fijados con formalina y embebidos en parafina. Se prepararon secciones de tejido de 4 μm a partir de cada bloque FFPE de muestra (fijadas con formalina y embebidas en parafina), montadas en portaobjetos adhesivos (SuperFrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific) y horneadas durante 60 minutos a 60 °C. Antes de la tinción, las secciones de tejido FFPE se desparafinaron. Las secciones se calentaron a ebullición en ácido cítrico 10 mM suplementado con Tween-20 al 0,05% (pH 6,0) a 120 °C durante 10 min. Las peroxidasa endógenas se inactivaron mediante incubación en H_2O_2 al 0,3% en PBS durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, los sitios de unión de anticuerpos inespecíficos se bloquearon durante 30 minutos con tampón de bloqueo (suero de cabra al 10% en PBS) a temperatura ambiente, seguido de incubación durante la noche con 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo primario de conejo anti-Claudin-6 (IBL- América, 18865) diluido en tampón de bloqueo. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario listo para usar (cabra anti-conejo conjugado con HRP Power Vision; Inmunologic) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La visualización se realizó durante 4:30 minutos utilizando la solución sustrato-cromógeno (VectorRed; Vector Laboratories). Después de la contratinción con hematoxilina, deshidratación y montaje, las secciones se analizaron usando un microscopio Leica DM2000.

45 Tratamiento de tumores de xenoinjerto de MKN74 subcutáneo avanzado e inmunohistoquímica de secciones tumorales:

50 La línea celular de carcinoma gástrico humano MKN74 se cultivó en condiciones estándar. Para el injerto, se inocularon en forma subcutánea ratones Hsd:*Foxn1*^{nu} desnudos atímicos hembra de 6-8 semanas de edad con 1×10^7 células MKN74 en 200 μL de PBS en el costado. En el estudio de tratamiento avanzado, los tumores crecieron durante 7 días y los ratones con tumores establecidos de $200 \pm 30 \text{ mm}^3$ de volumen se asignaron al azar en grupos de vehículo y anticuerpo (n = 10) antes del tratamiento. El volumen del tumor ($VT = (\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$) se controló cada dos semanas. El VT se expresa en mm^3 , lo que permite la construcción de curvas de crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

55 Los animales recibieron tampón de control de vehículo o 16 mg/kg de IMAB027-vcMMAE el día 8 mediante una sola inyección iv en bolo. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen mayor de 1400 mm^3 o se ulceraron. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn. La inhibición del crecimiento tumoral se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney y la prueba de comparación múltiple post-hoc de Dunn. La supervivencia se analizó mediante la prueba de Mantel Cox.

60 La expresión objetivo de CLDN6 en células MKN74 se analizó por injerto previo con citometría de flujo y por histoquímica en xenoinjertos de MKN74 no tratados diseccionados el día 31.

65 Para inmunohistoquímica, se prepararon secciones de tejido con un espesor de 3 μm , se montaron en portaobjetos y

se secaron al aire durante 90 minutos a temperatura ambiente. Todas las secciones de tejido se fijaron durante 10 minutos en acetona a -20 °C y se lavaron durante 5 minutos en PBS. Las peroxidasas endógenas se inactivaron mediante incubación de 15 minutos con peróxido de hidrógeno al 0,03% (Dakocytomation EnVision System, K4011). Después de lavar con PBS, los sitios de unión de anticuerpos inespecíficos se bloquearon durante 30 minutos con tampón de bloqueo (suero de cabra al 10% en PBS) a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 60 minutos con 5 µg/mL de IMAB027-FITC a temperatura ambiente. Luego, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario listo para usar (IgG anti-conejo conjugado con poli-HRP Bright Vision, Immunologic, DPVR-110HRP) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La visualización se realizó durante 2:30 min utilizando la solución de sustrato-cromógeno (VectorRed; Vector Laboratories). Después de la contraincubación con hematoxilina, deshidratación y montaje, las secciones se analizaron usando un microscopio Leica DM2000.

Tratamiento de los tumores de xenoinjerto PA-1 (Luc) intraperitoneal avanzado:

La línea celular de teratocarcinoma de ovario humano PA-1 (Luc) que expresa establemente luciferasa de luciérnaga como gen indicador luminiscente se usó como un modelo de tumor de xenoinjerto intraperitoneal para estudiar la actividad antitumoral de anticuerpos IMAB027 conjugados con toxina *in vivo*. Experimentos previos de injerto revelaron que la inoculación intraperitoneal de células PA-1 (Luc) dio como resultado nódulos tumorales intraperitoneales.

Se inyectaron 1×10^7 células PA-1(Luc) resuspendidas en PBS en forma intraperitoneal en ratones Hsd:Foxn1^{nu} desnudos atímicos hembra. Las imágenes de bioluminiscencia comenzaron el día 14 después de la inoculación de las células tumorales y posteriormente semanalmente hasta la finalización del estudio. La D-luciferina (PerkinElmer, 122796) se disolvió en agua estéril y se inyectó por vía intraperitoneal (150 mg/kg, volúmenes de inyección de 200 µL) 5 minutos antes de la obtención de imágenes con el sistema de obtención de imágenes IVIS Lumina (Advanced Molecular Vision). Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se colocaron en la cámara oscura de IVIS Lumina y se cuantificaron los fotones emitidos para un tiempo de integración de 1 minuto. La intensidad de la luz transmitida que se origina de las células PA-1 que expresan luciferasa dentro del animal se representó como una imagen de pseudocolor, en la que el azul es la señal de bioluminiscencia menos intensa y el rojo la más intensa. También se obtuvieron imágenes fotográficas en escala de grises de ratones bajo iluminación LED con poca luz. Las imágenes se superpusieron utilizando el software Living Image (Xenogen). Se utilizaron ajustes de iluminación comparables para todas las imágenes. Para cuantificar la bioluminiscencia, se determinaron las regiones de interés (ROI) y se midió el flujo total de las ROI respectivas con una unidad de fotones/s (p/s). Un valor de bioluminiscencia de fondo obtenido de una región que no emite señales en el animal se resta del valor de bioluminiscencia respectivo para cada animal.

El día 14, los ratones se asignaron al azar y se trataron mediante administración intraperitoneal de 16 mg/kg de IMAB027-DM1 o IMAB027-vcMMAE, respectivamente. Los animales de control recibieron tampón de vehículo. El crecimiento tumoral se controló semanalmente mediante imágenes de bioluminiscencia desde vistas ventrales y análisis posterior del flujo total (fotones/s) en regiones de interés que cubren el abdomen del ratón.

Endocitosis:

La endocitosis del anticuerpo unido a CLDN6 se determinó usando un ensayo de endocitosis basado en citotoxicidad que se basa en la co-internalización del anticuerpo unido al objetivo y un fragmento Fab anti-IgG humano conjugado con saporina (Fab-ZAP humano, Advanced Targeting Systems, IT-51). La saporina es una proteína inactivadora de ribosomas que, tras la internalización, inhibe la biosíntesis de proteínas y, por lo tanto, produce la muerte celular.

Las células PA-1 se cosecharon con tripsina/EDTA al 0,05% (Gibco, 25300-054) y se sembraron $2,5 \times 10^3$ células/pozo en 50 µL de medio de crecimiento en una placa de cultivo de 96 pozos. Después de 24 horas, se añadieron Fab-ZAP y posteriormente IMAB027 o anticuerpo de control de isotipo en un volumen de 25 µL cada uno. Los anticuerpos de CLDN6 se administraron en una serie de dilución de 6 u 8 etapas, mientras que se aplicaron concentraciones constantes de Fab-ZAP (Fab-ZAP: relación de anticuerpos 3:1 a 6561:1). Las células se cultivaron durante 72 horas adicionales en una incubadora de CO₂ humidificada a 37 °C. Posteriormente, se analizó la viabilidad celular utilizando el kit de proliferación celular II de AppliChem (AppliChem, A8088-1000) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro (Tecan) a 480 nm (referencia 630 nm).

Listado de secuencias

<110> BioNTech AG et al.

<120> DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DEL CÁNCER QUE IMPLICA CÉLULAS MADRE CANCEROSAS

<130> 342-79 PCT

<150> PCT/EP2013/002272

<151> 2013-07-31

<160> 12

ES 2 807 181 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu

```

ES 2 807 181 T3

165 170 175

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

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

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

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

5

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Ser Leu Tyr Leu Gly Trp Ala Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu

10

ES 2 807 181 T3

165

170

175

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

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

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

<210> 3

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de anticuerpo

10

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Fragmento de anticuerpo

<400> 4

ES 2 807 181 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

5 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Fragmento de anticuerpo

<400> 5

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

15

ES 2 807 181 T3

85

90

95

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

<400> 7

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

ES 2 807 181 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 106
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento de anticuerpo

10 <400> 8

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 807 181 T3

<210> 9
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

<400> 9

10

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

<400> 10

20

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

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

ES 2 807 181 T3

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

10

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Fragmento de anticuerpo

ES 2 807 181 T3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a Claudina 6 (CLDN6) para usar en un método de tratamiento o prevención del cáncer que comprende inhibir y/o eliminar células madre cancerosas mediante la administración del anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 a un paciente con cáncer y mediante la administración de una quimioterapia, en el que el anticuerpo y la quimioterapia se administran en cantidades sinérgicamente efectivas, en el que el anticuerpo es capaz de mediar la muerte de células que expresan CLDN6 por ADCC y/o CDC y comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y
10 en el que la quimioterapia comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en carboplatino, gemcitabina, paclitaxel y cisplatino.
- 15 2. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en el que dicho método comprende radioterapia.
3. El anticuerpo para uso de la reivindicación 1 o 2, en el que la quimioterapia se administra a una dosis que está por debajo de la dosis máxima tolerada.
- 20 4. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la quimioterapia comprende administrar un agente seleccionado del grupo que consiste en taxanos, compuestos de platino, análogos de nucleósidos, análogos de camptotecina, antraciclinas, profármacos de los mismos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos, en particular un agente seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel, cisplatino, carboplatino, profármacos de los mismos, sales de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 25 5. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLDN6 se une al primer bucle extracelular de CLDN6.

Figura 1

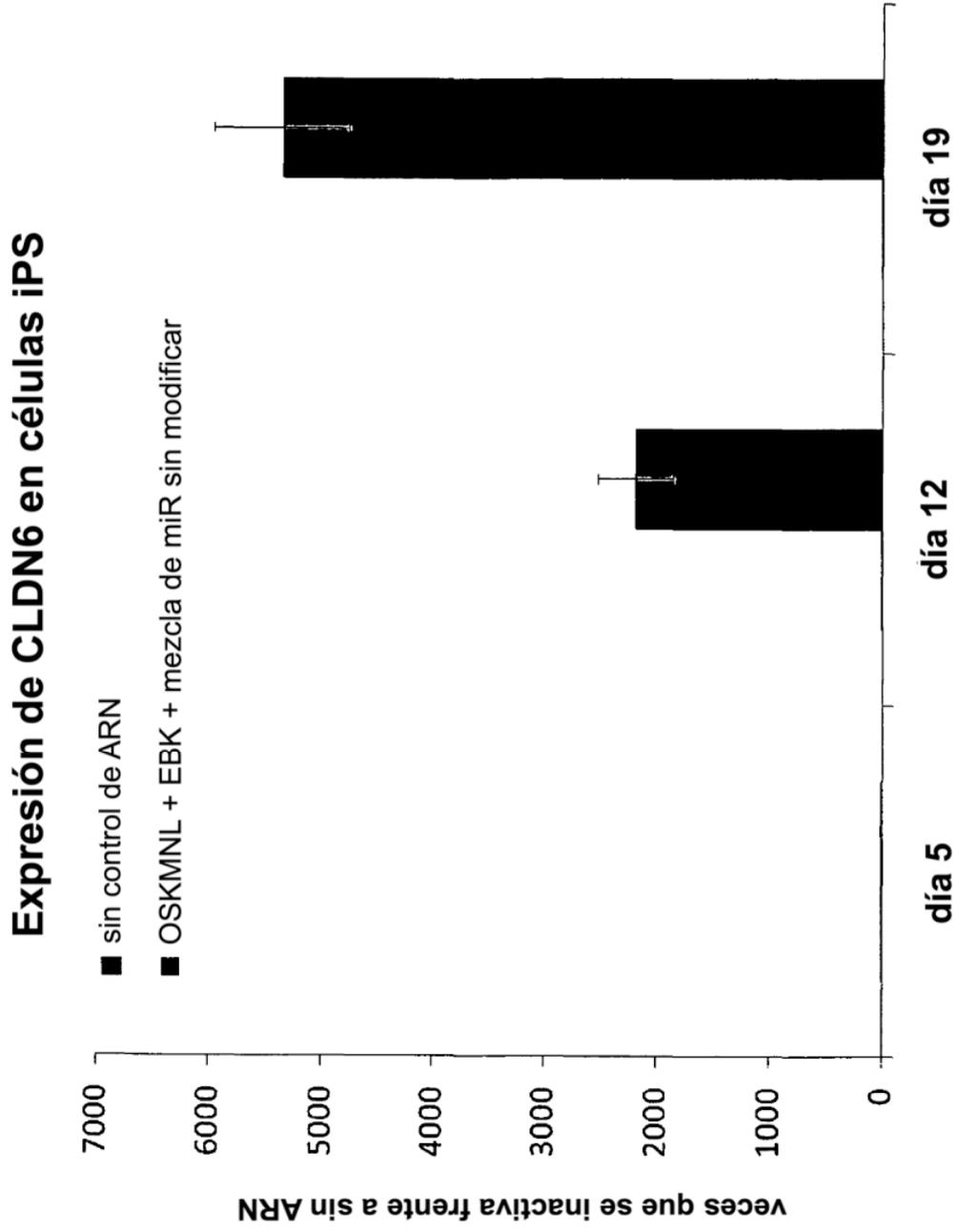


Figura 2

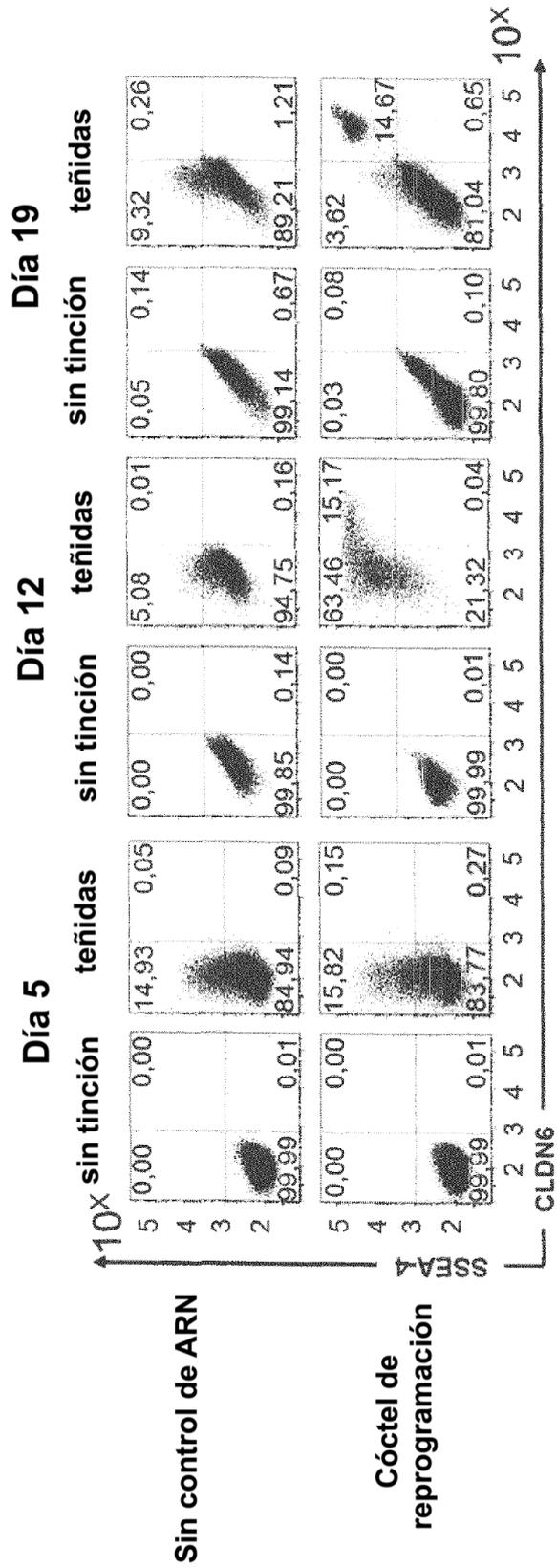
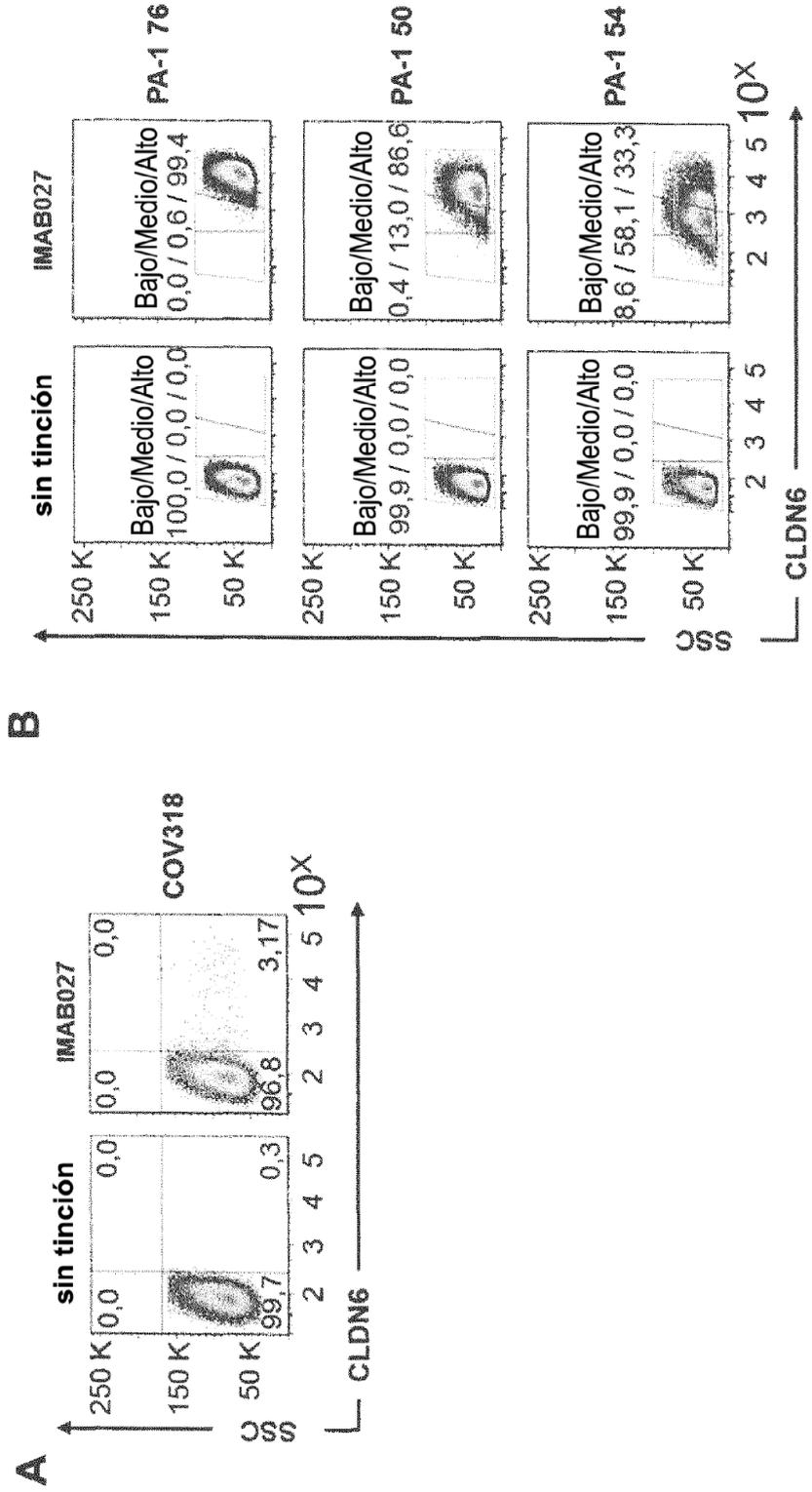
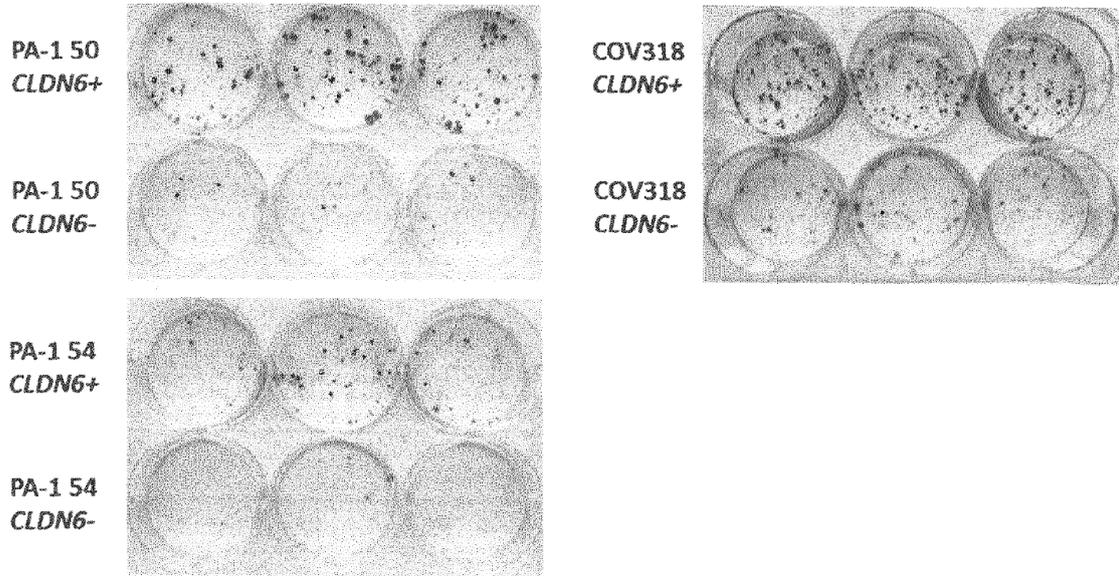


Figura 3



A



B

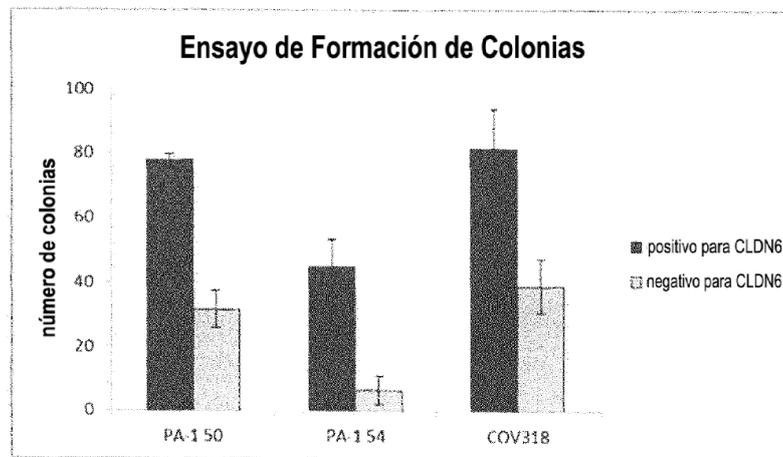


Figura 4

Figura 5

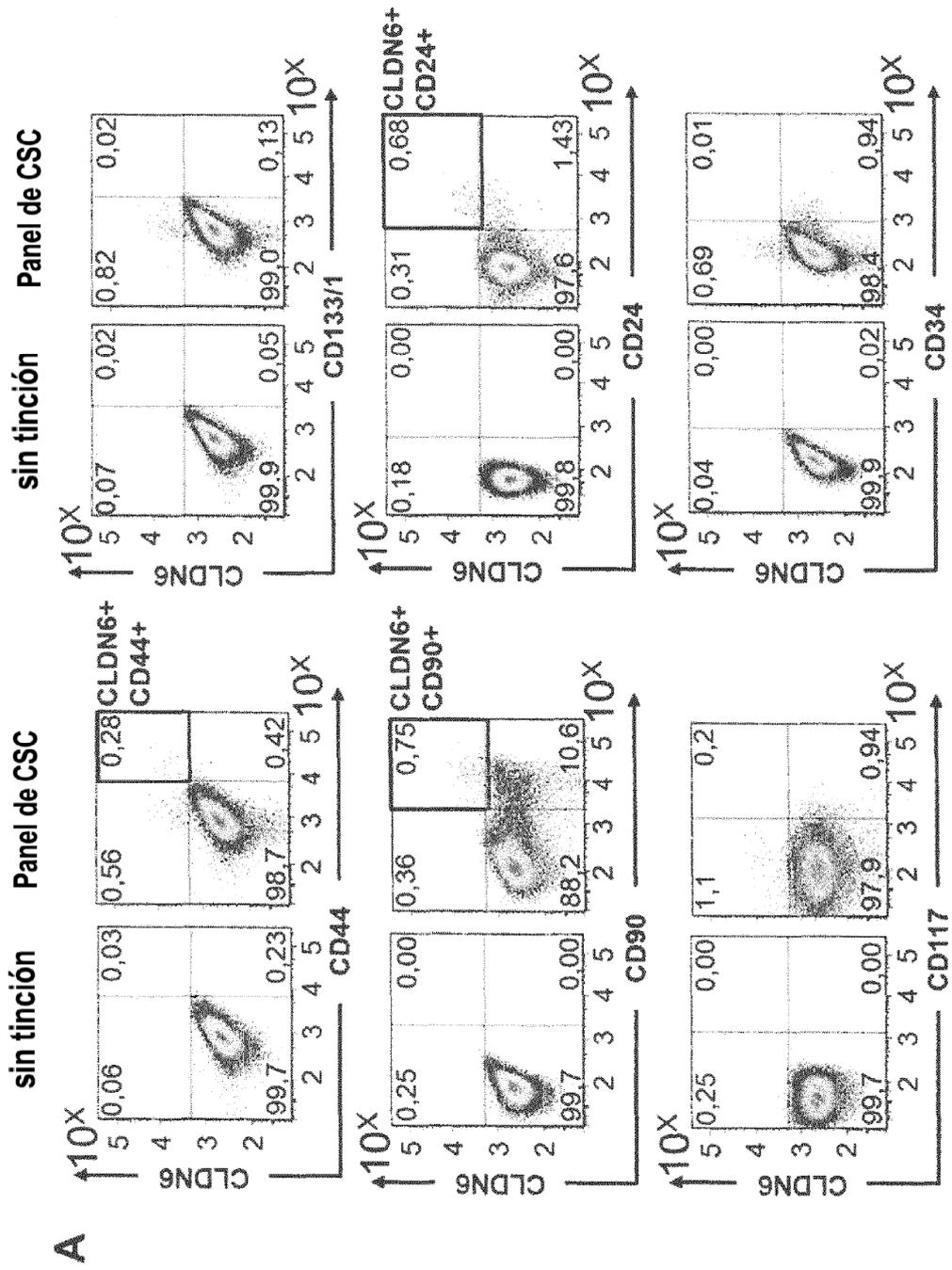


Figura 5

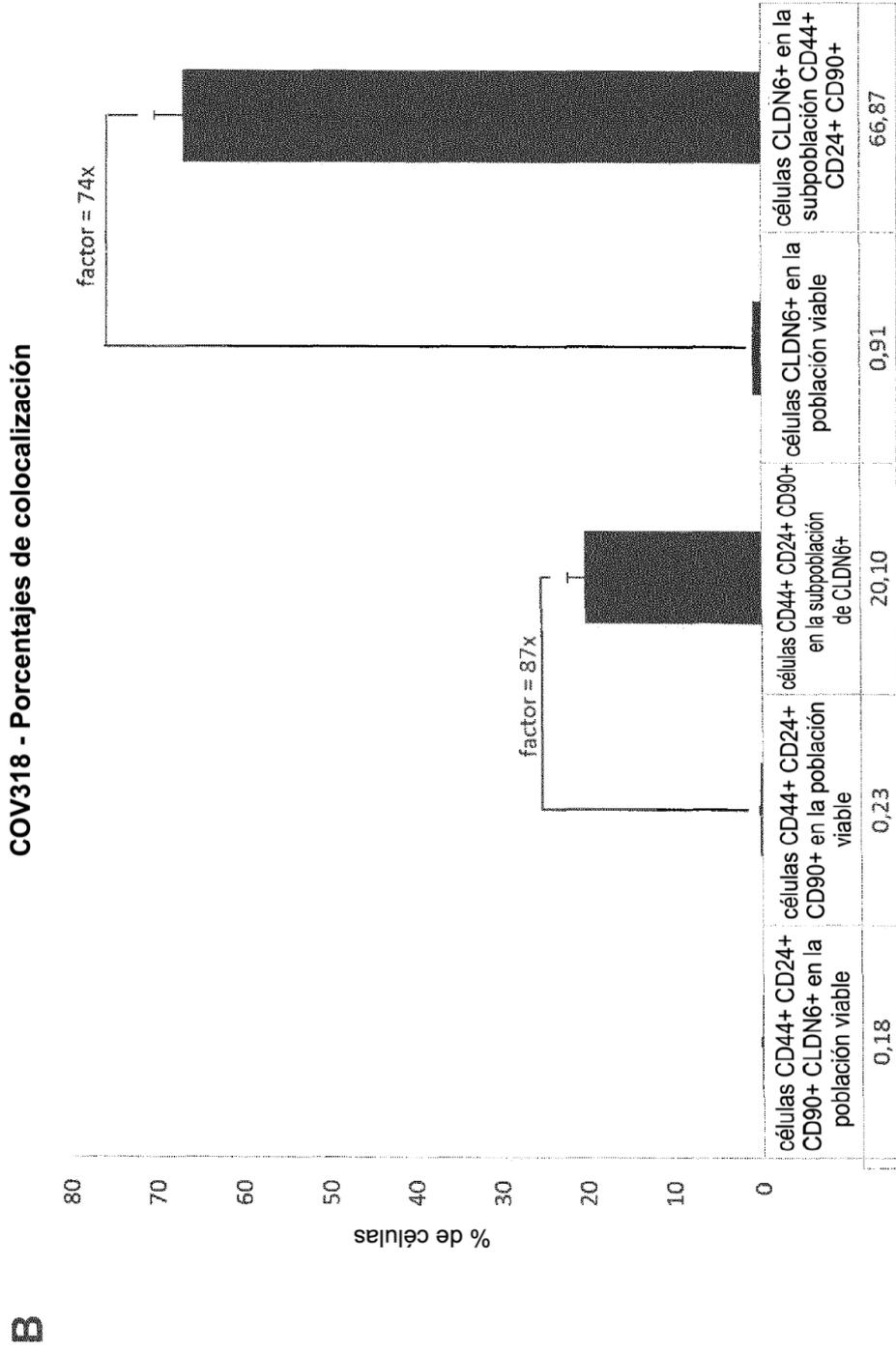
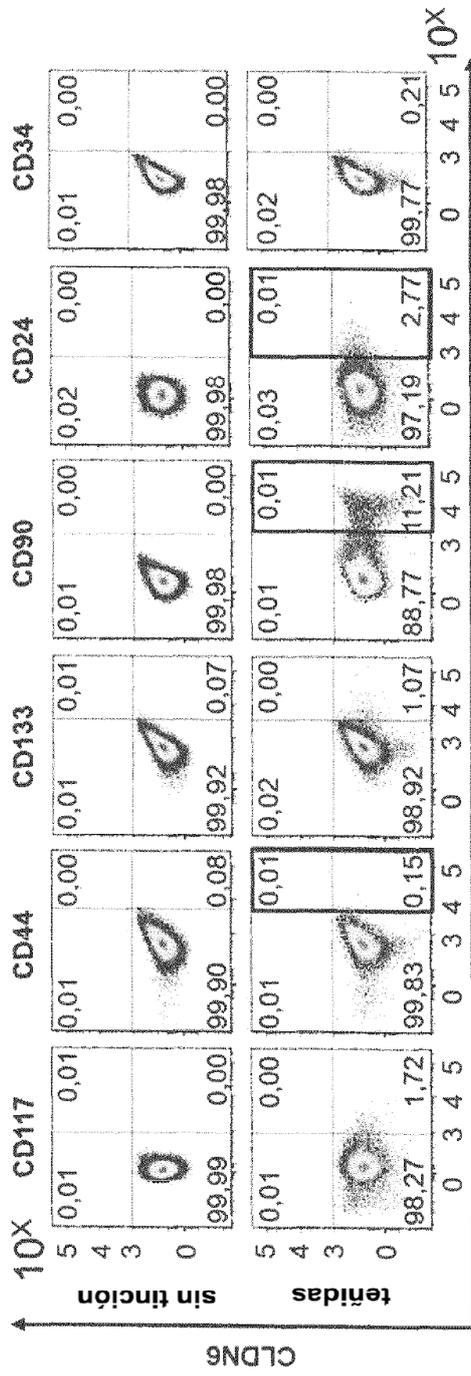


Figura 6
A COV318 - fracción negativa para CLDN6



COV318 - fracción positiva para CLDN6

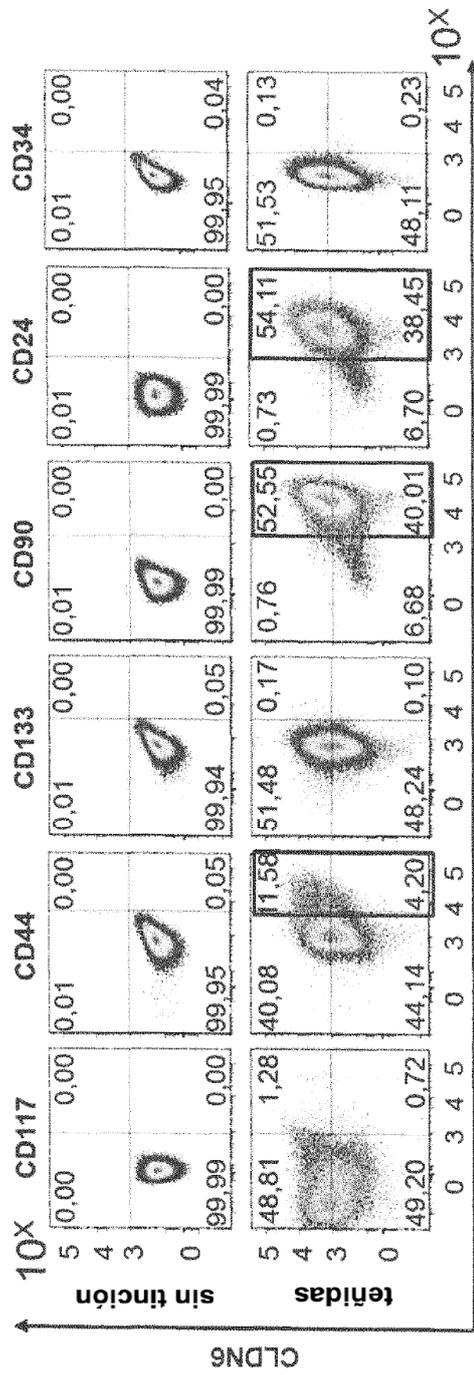


Figura 6

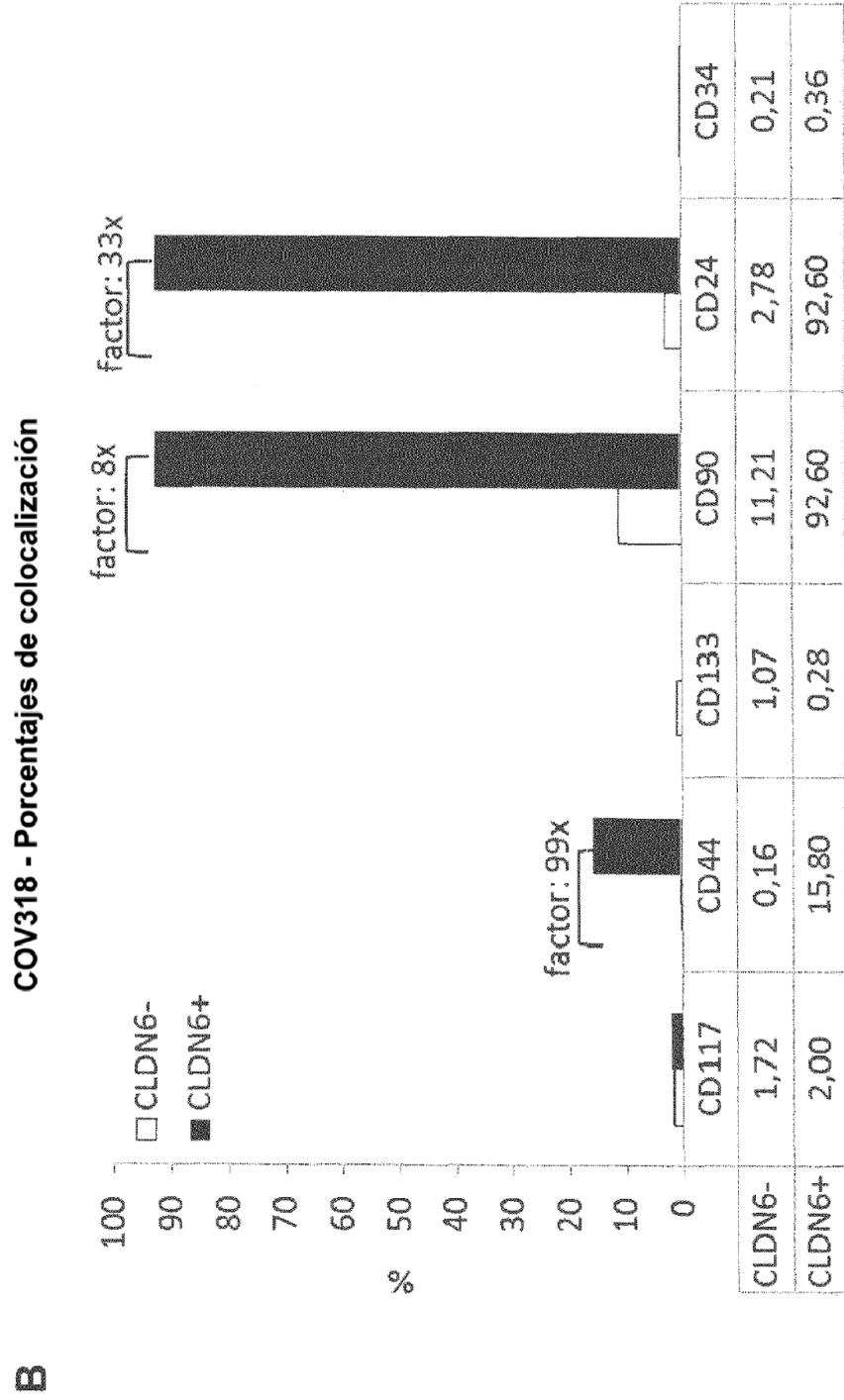


Figura 7

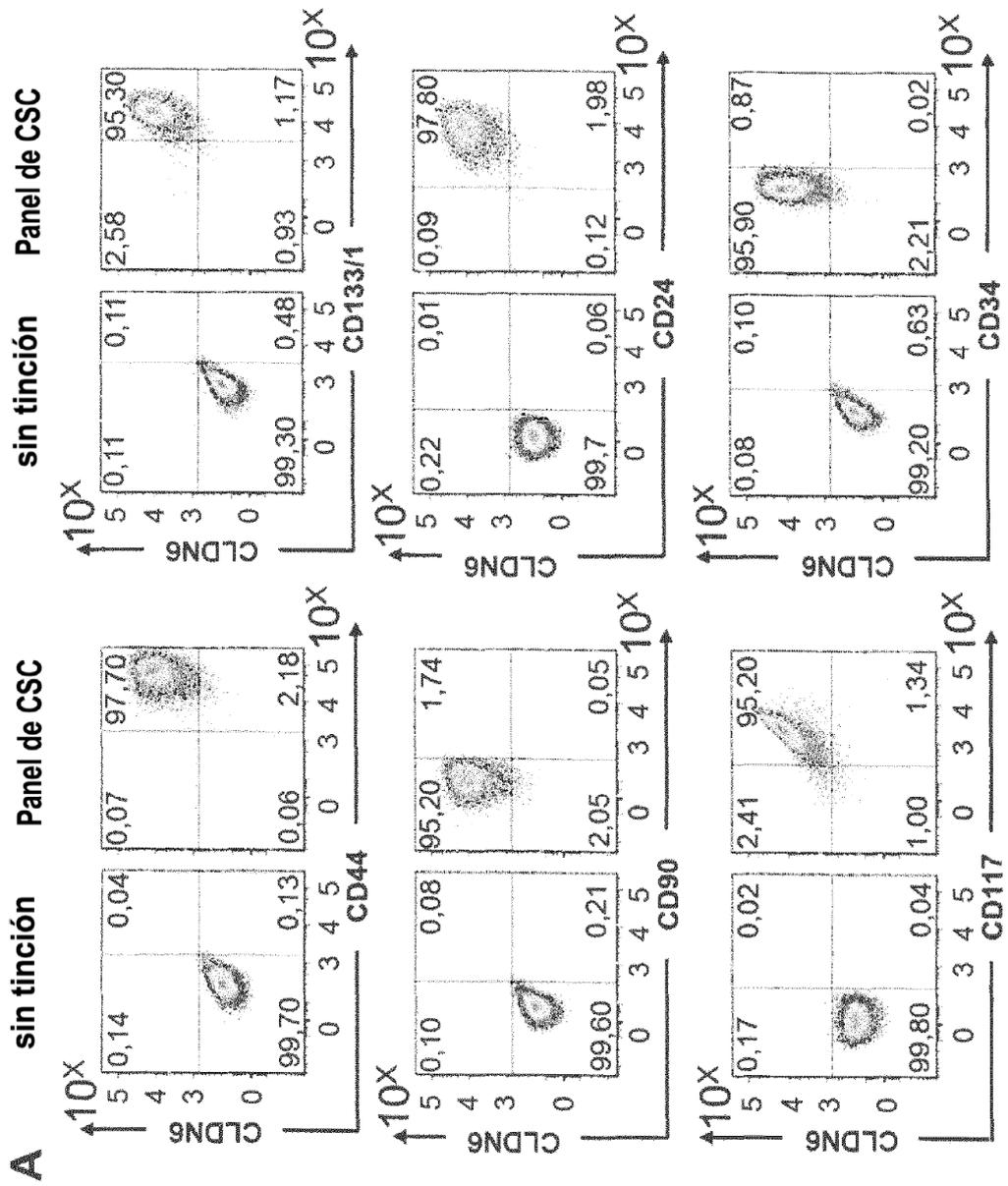


Figura 7

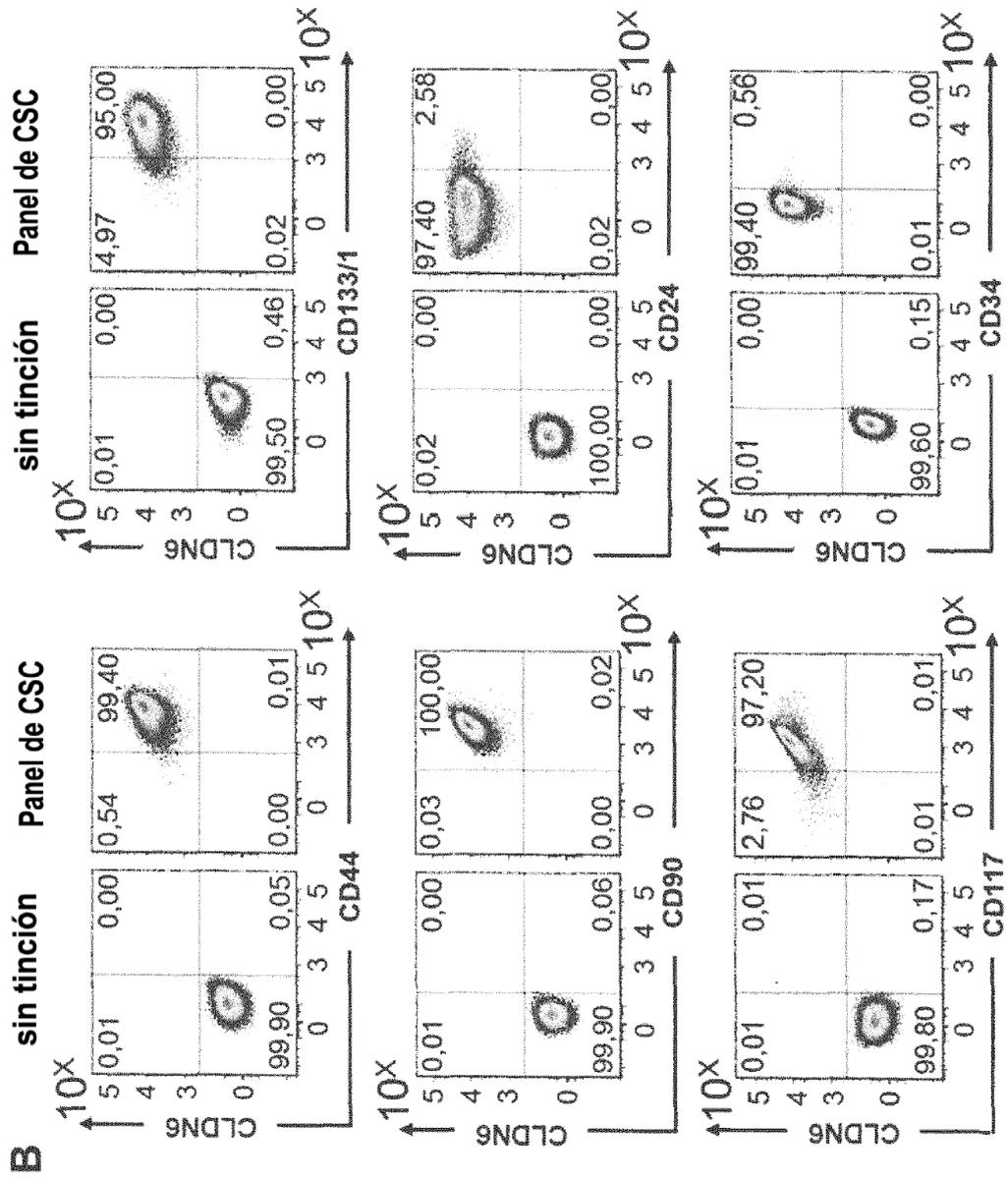


Figura 7

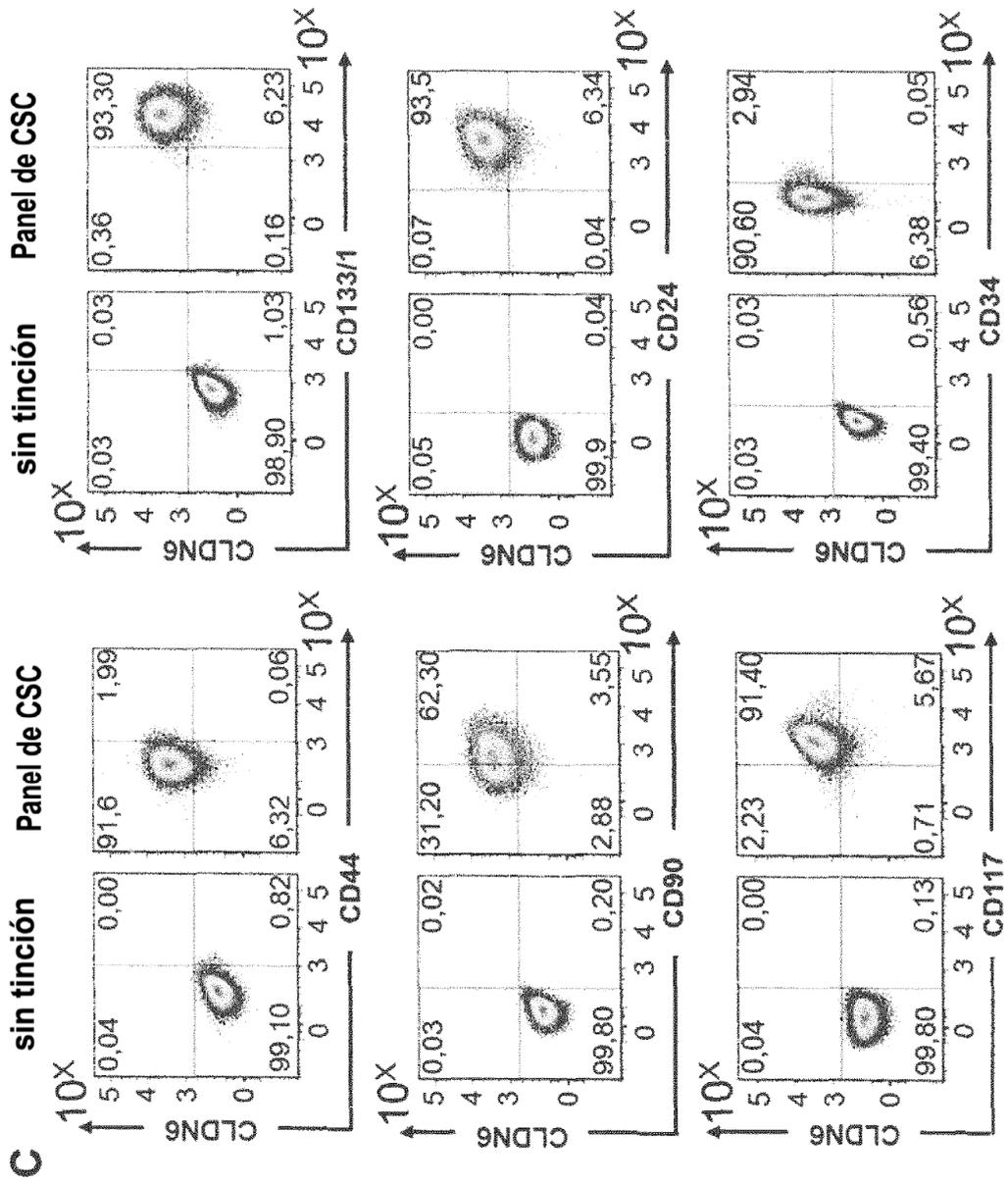


Figura 7

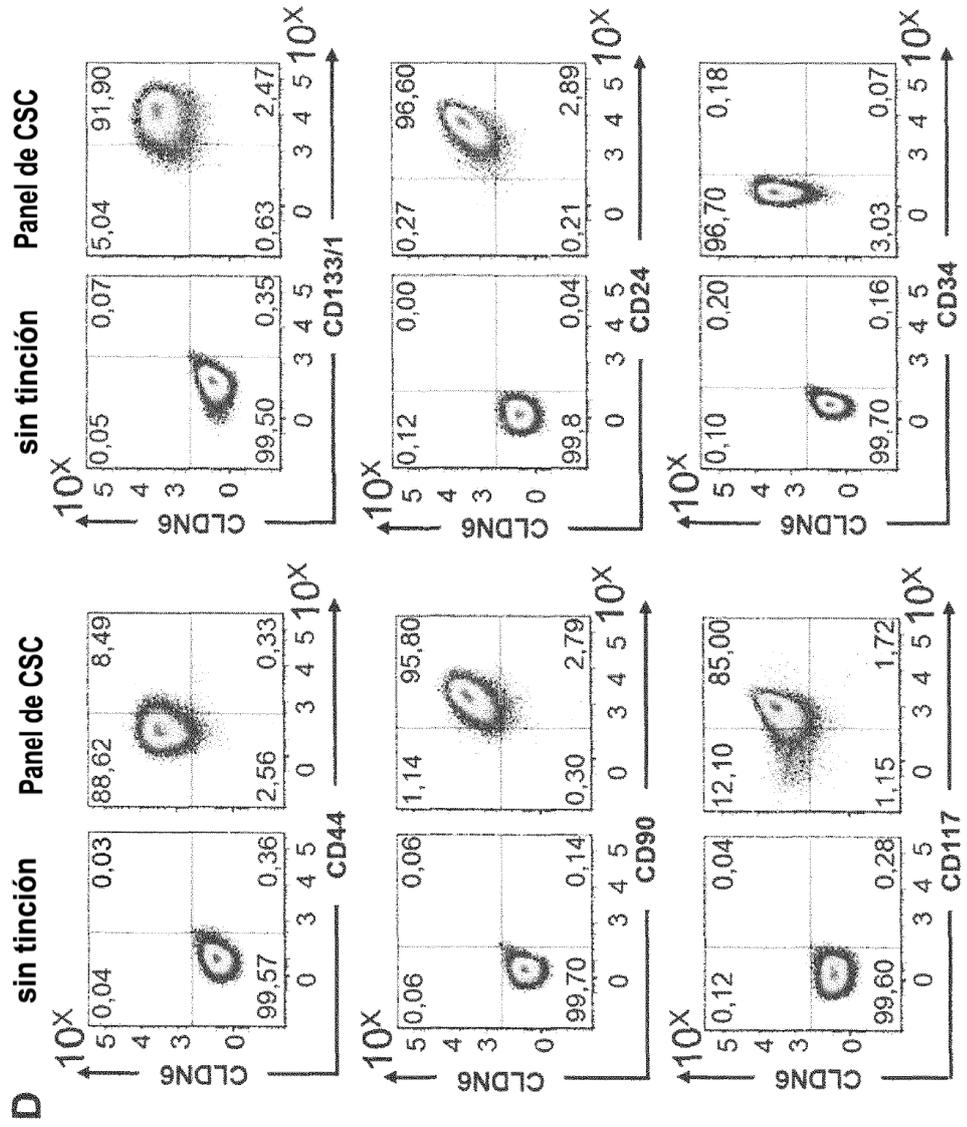


Figura 8

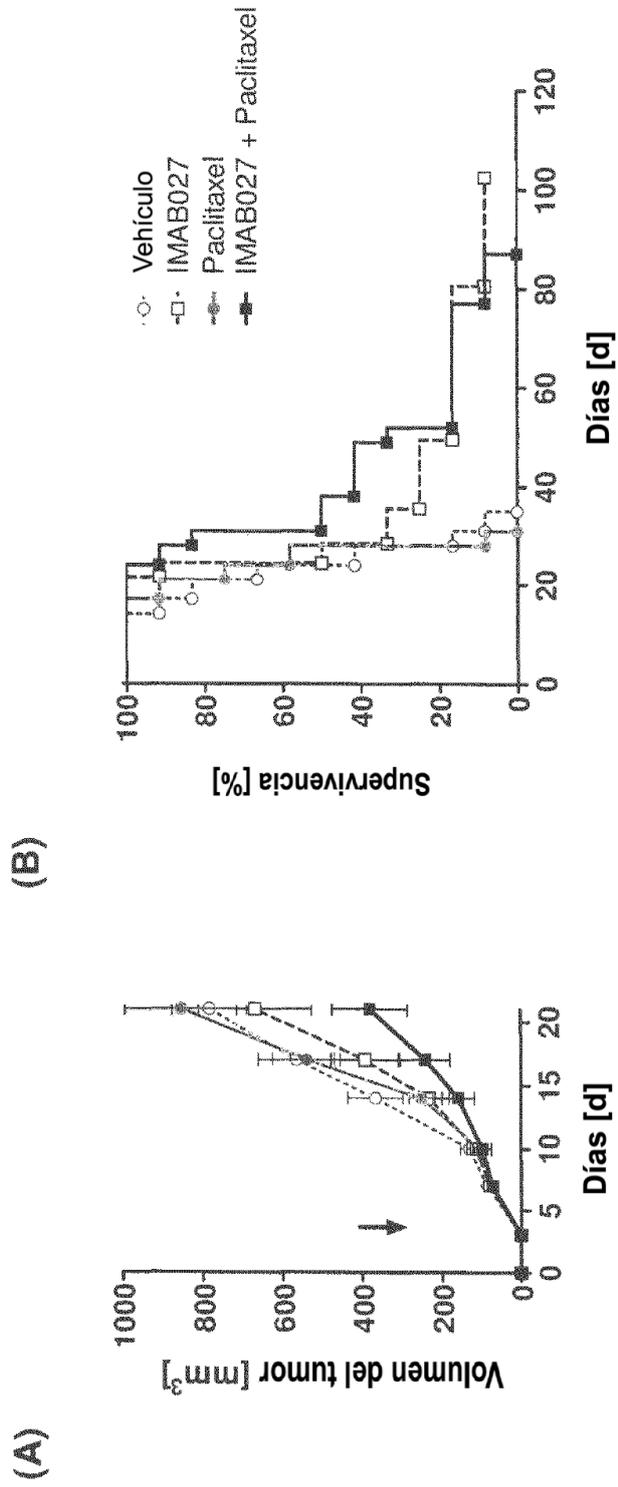


Figura 9

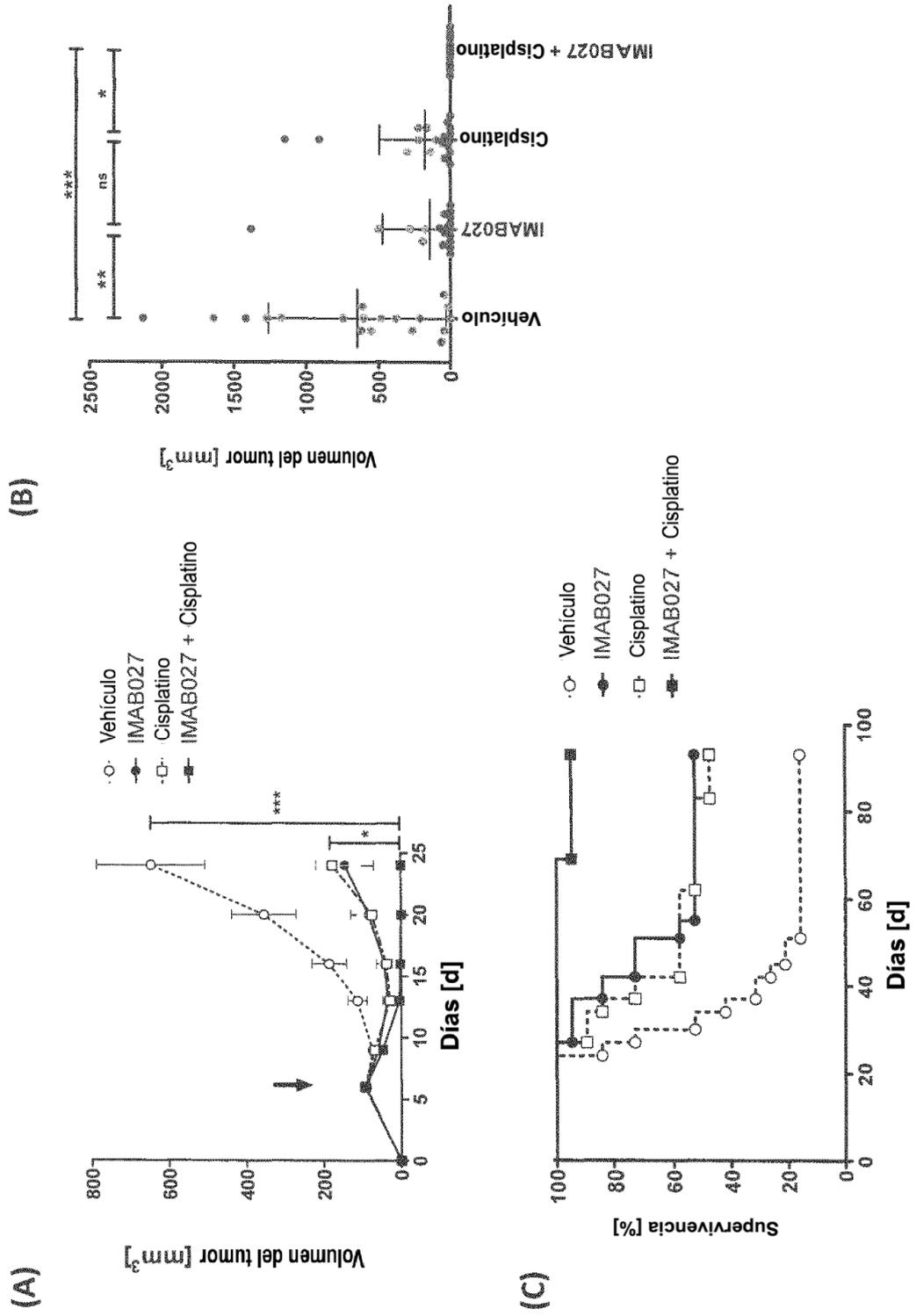


Figura 10

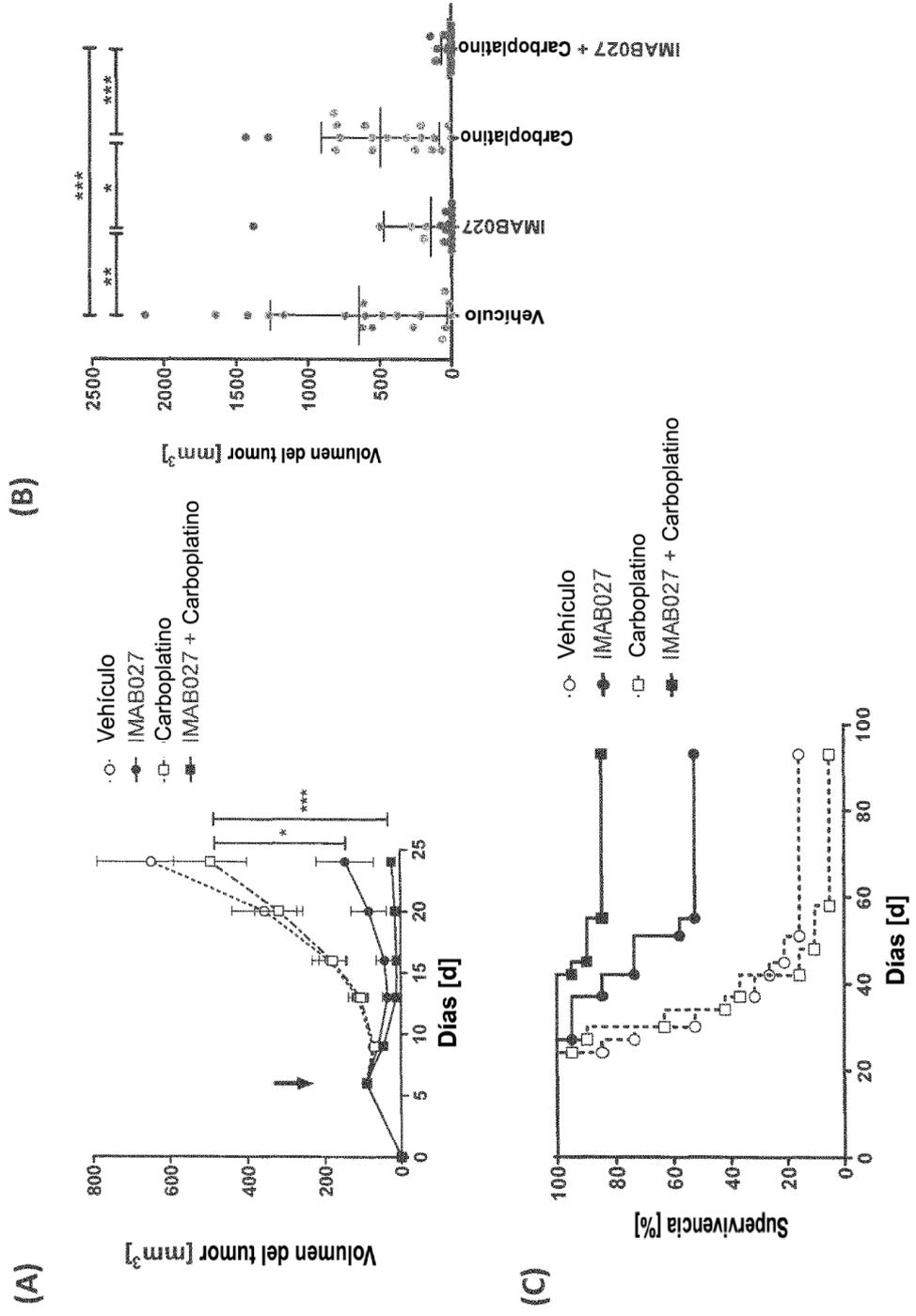
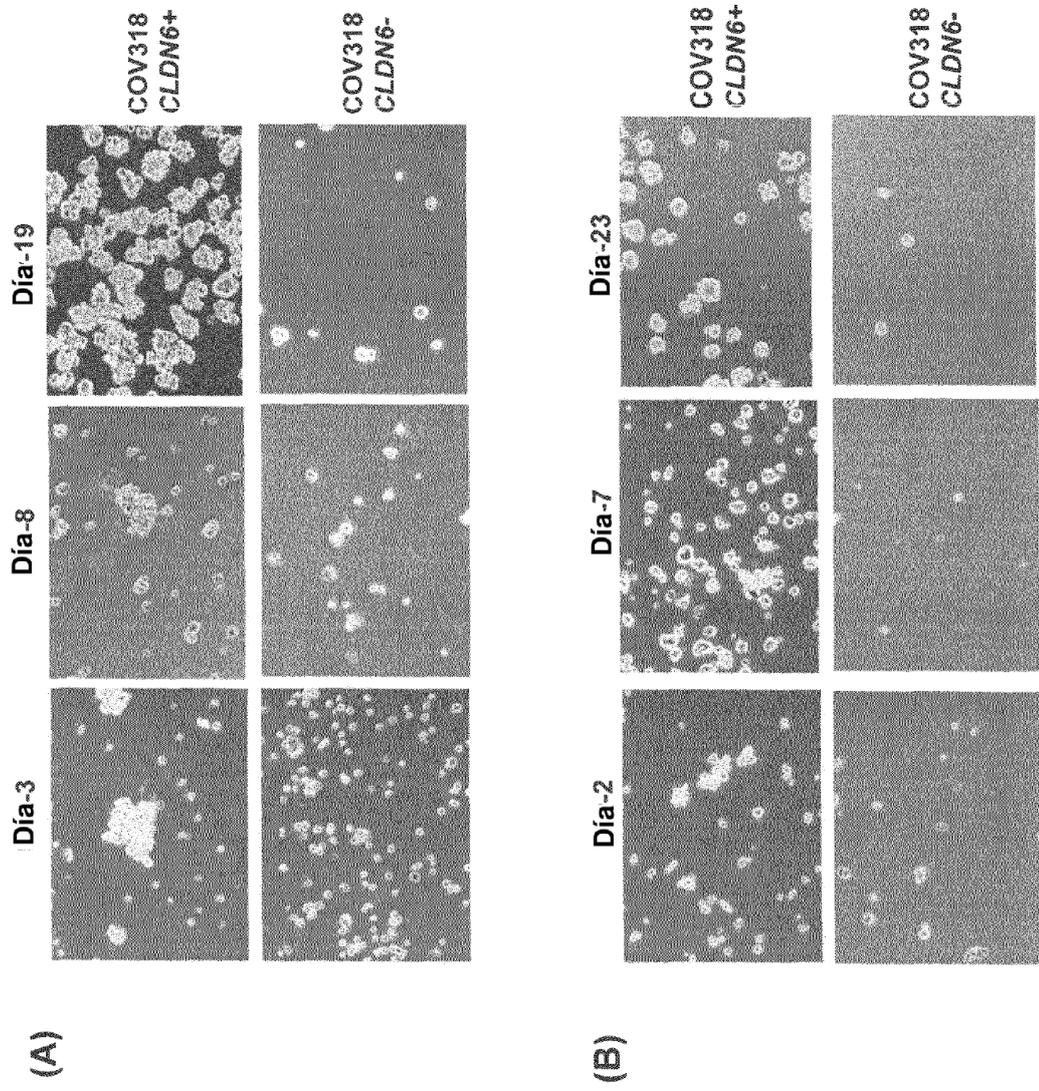


Figura 11



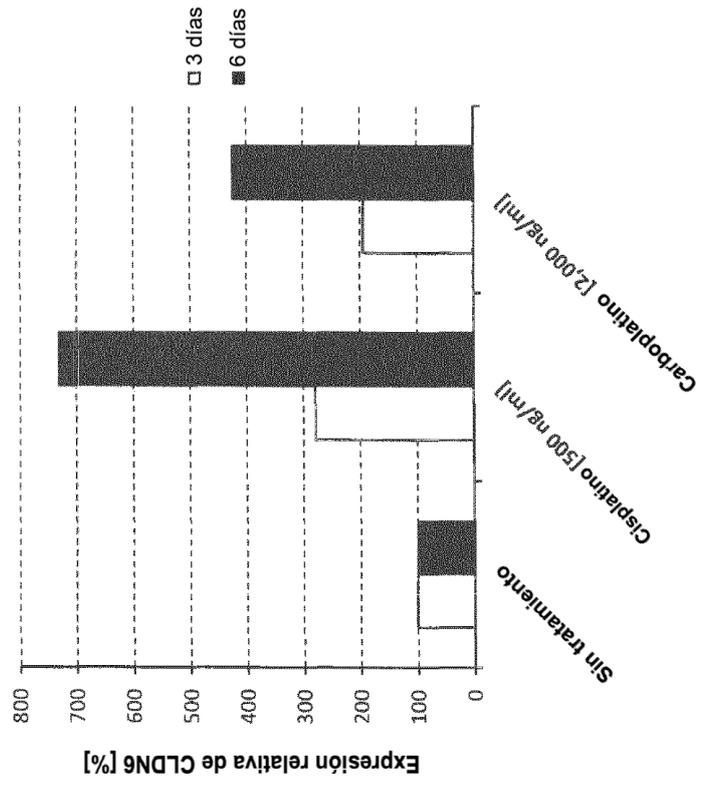


Figura 12

Figura 13

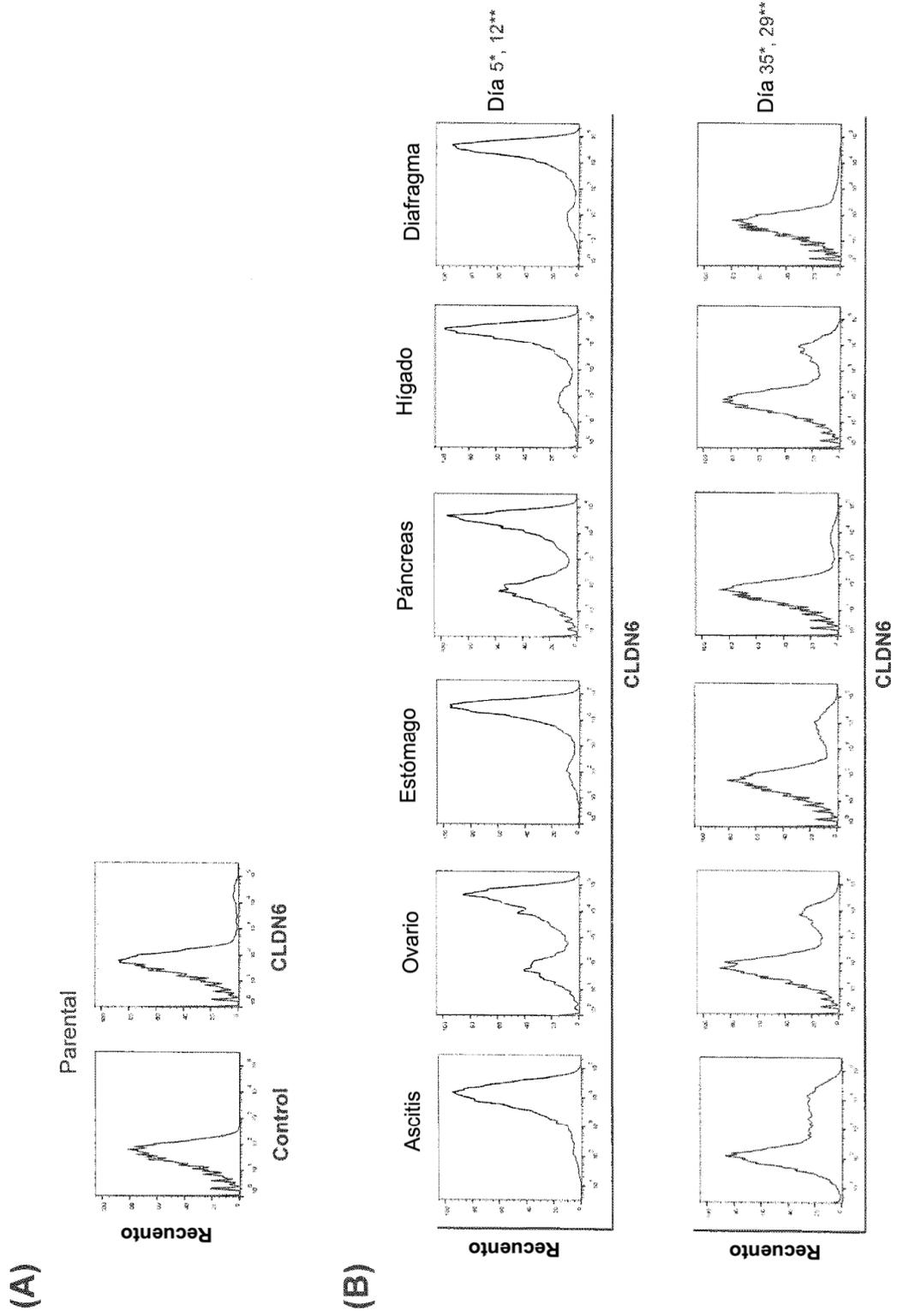


Figura 14

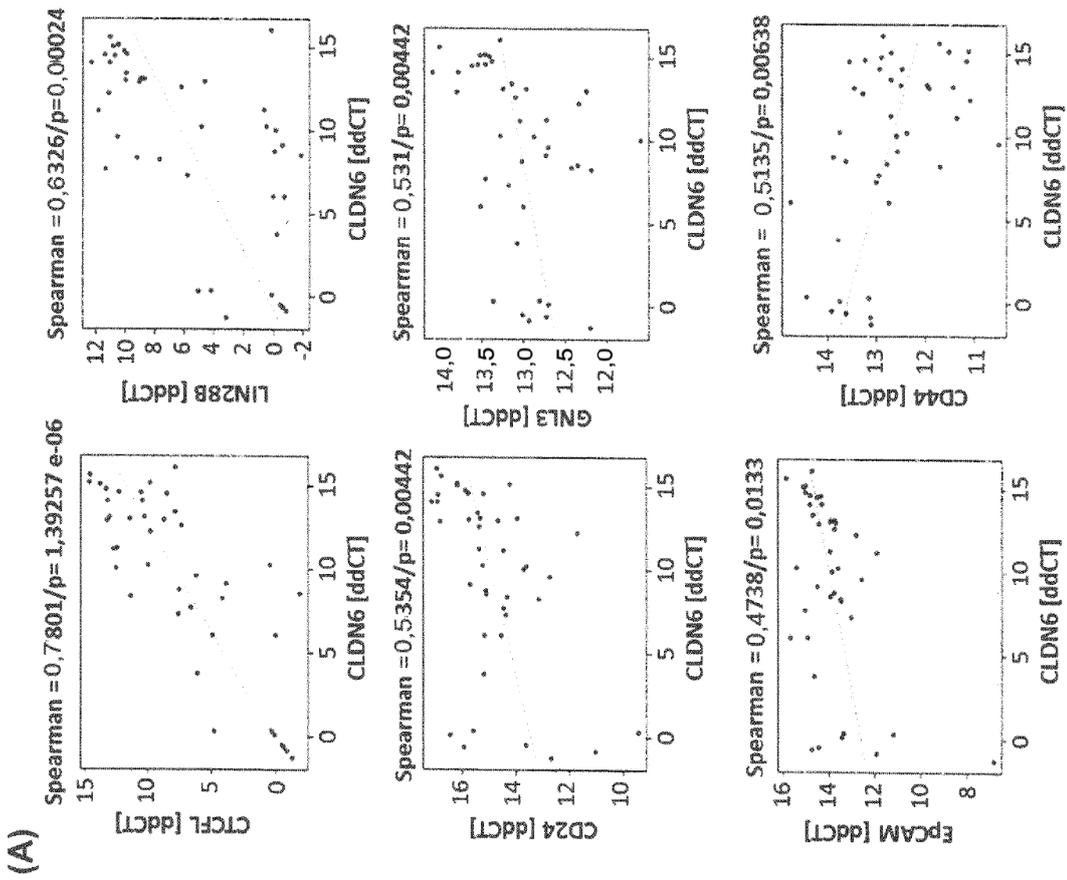


Figura 15

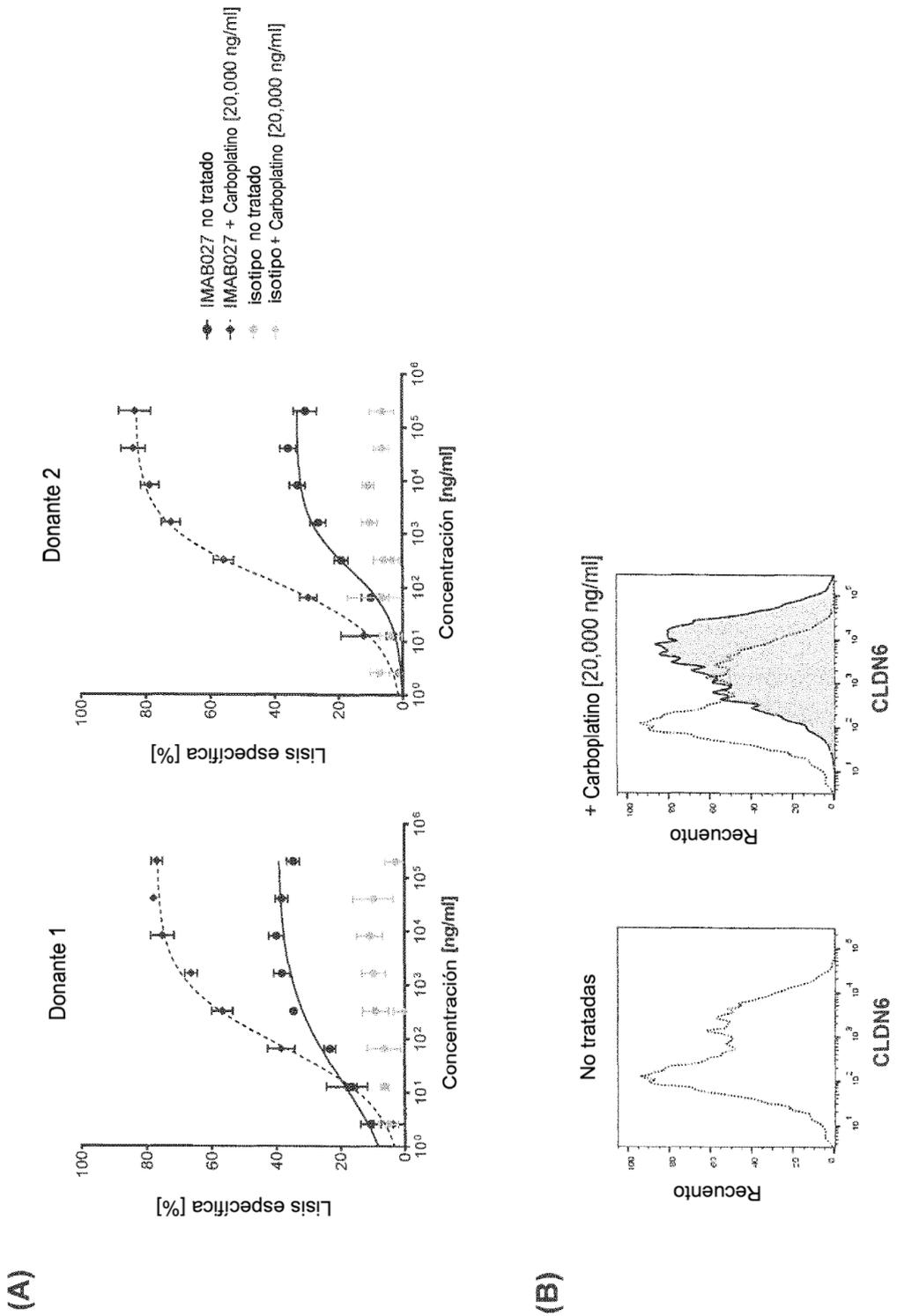
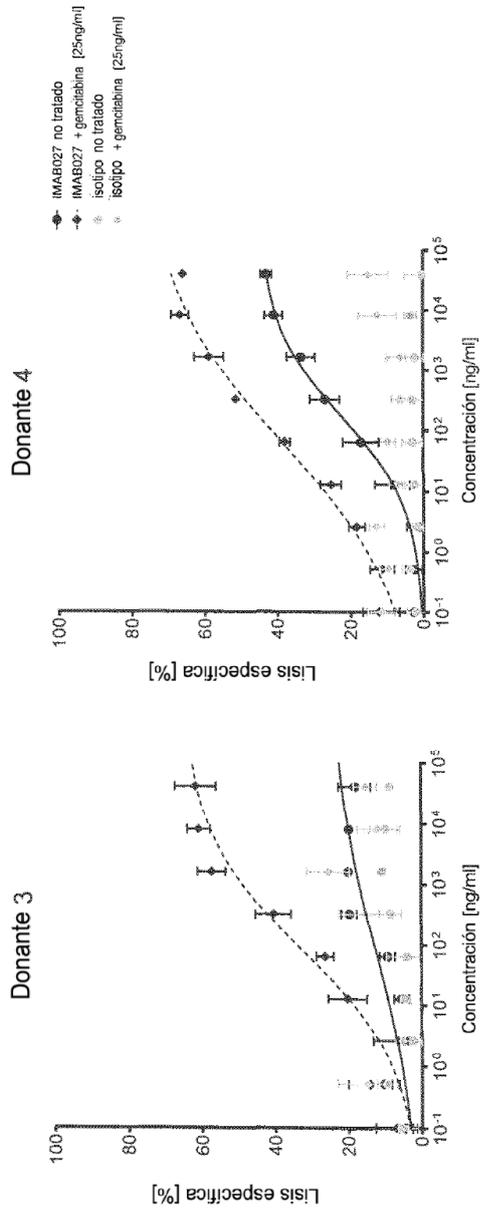


Figura 15

(C)



(D)

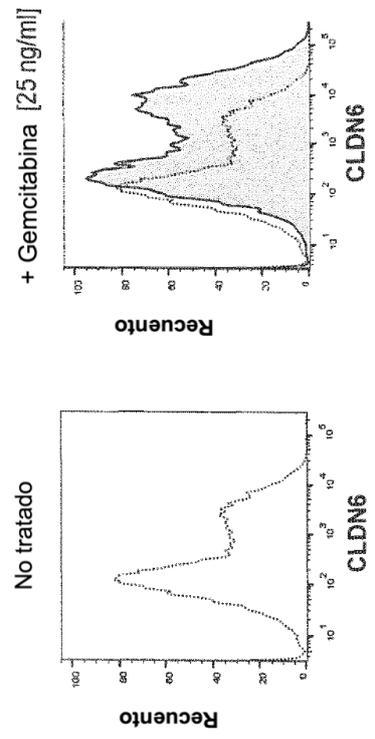


Figura 15

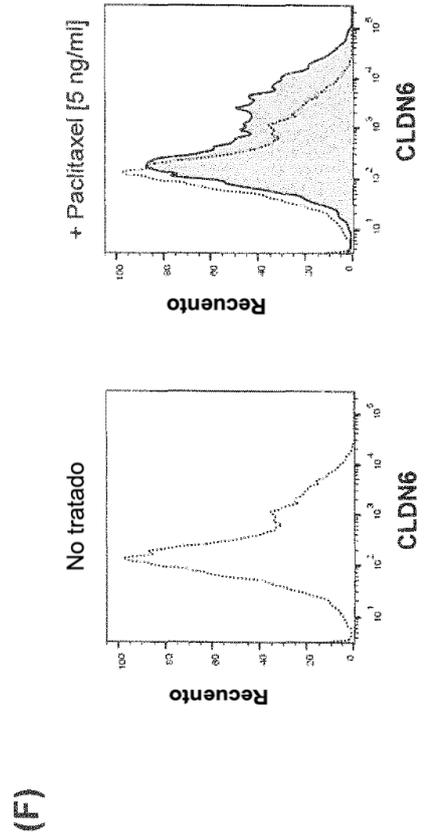
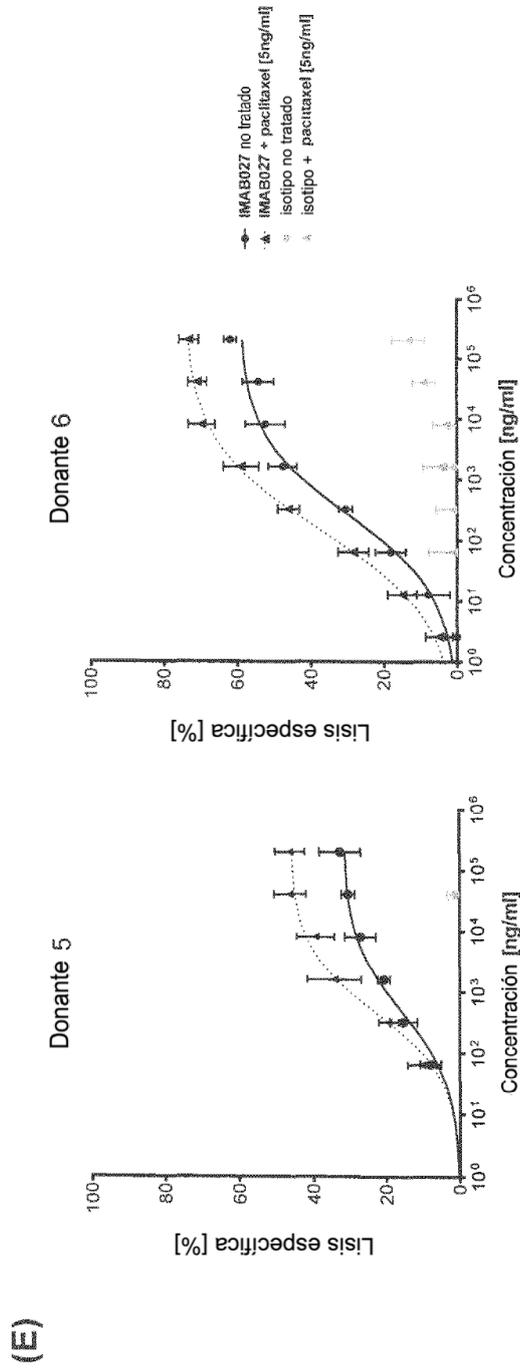
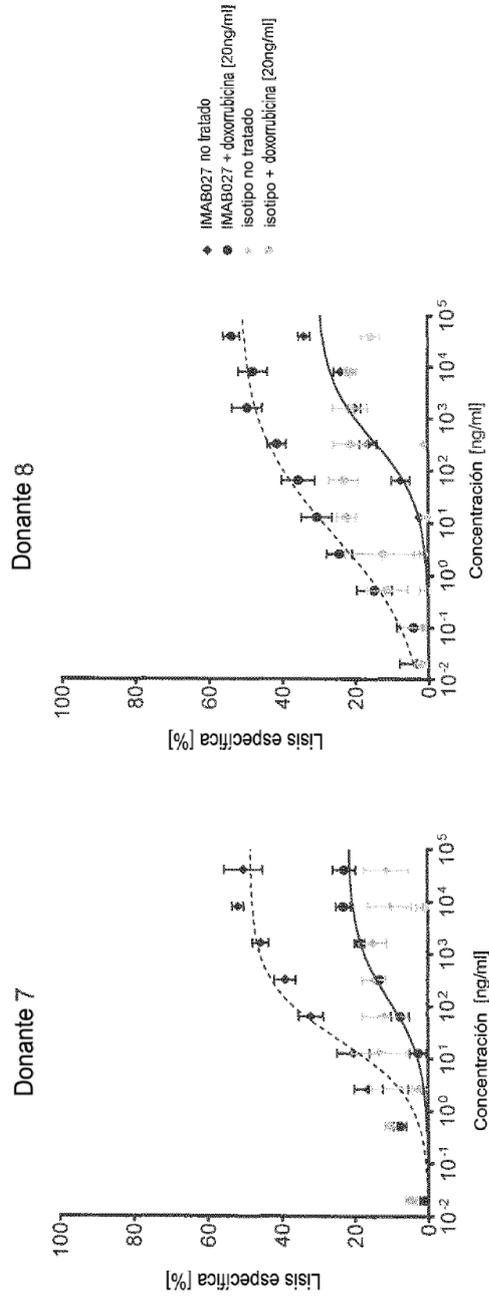


Figura 15

(G)



(H)

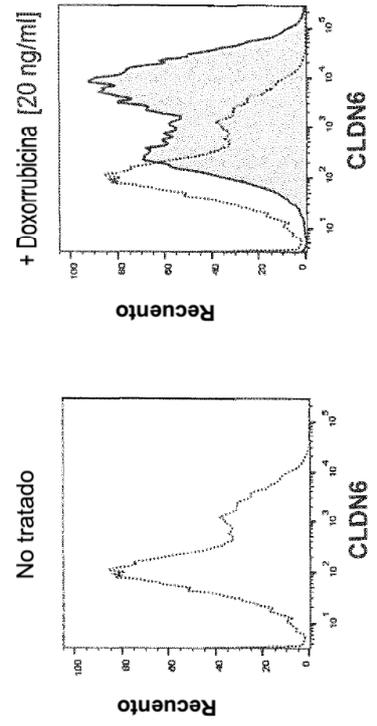


Figura 15

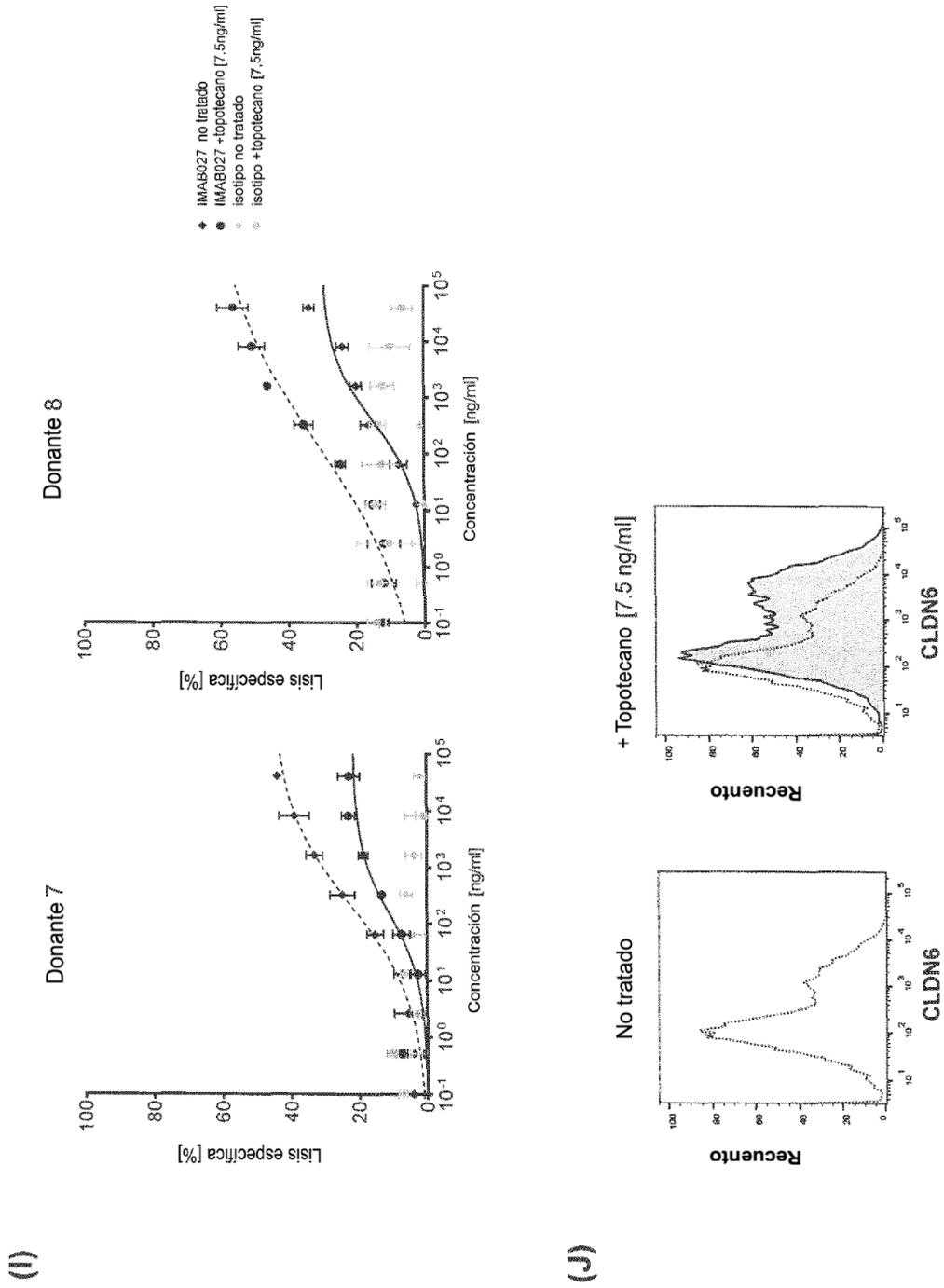


Figura 16

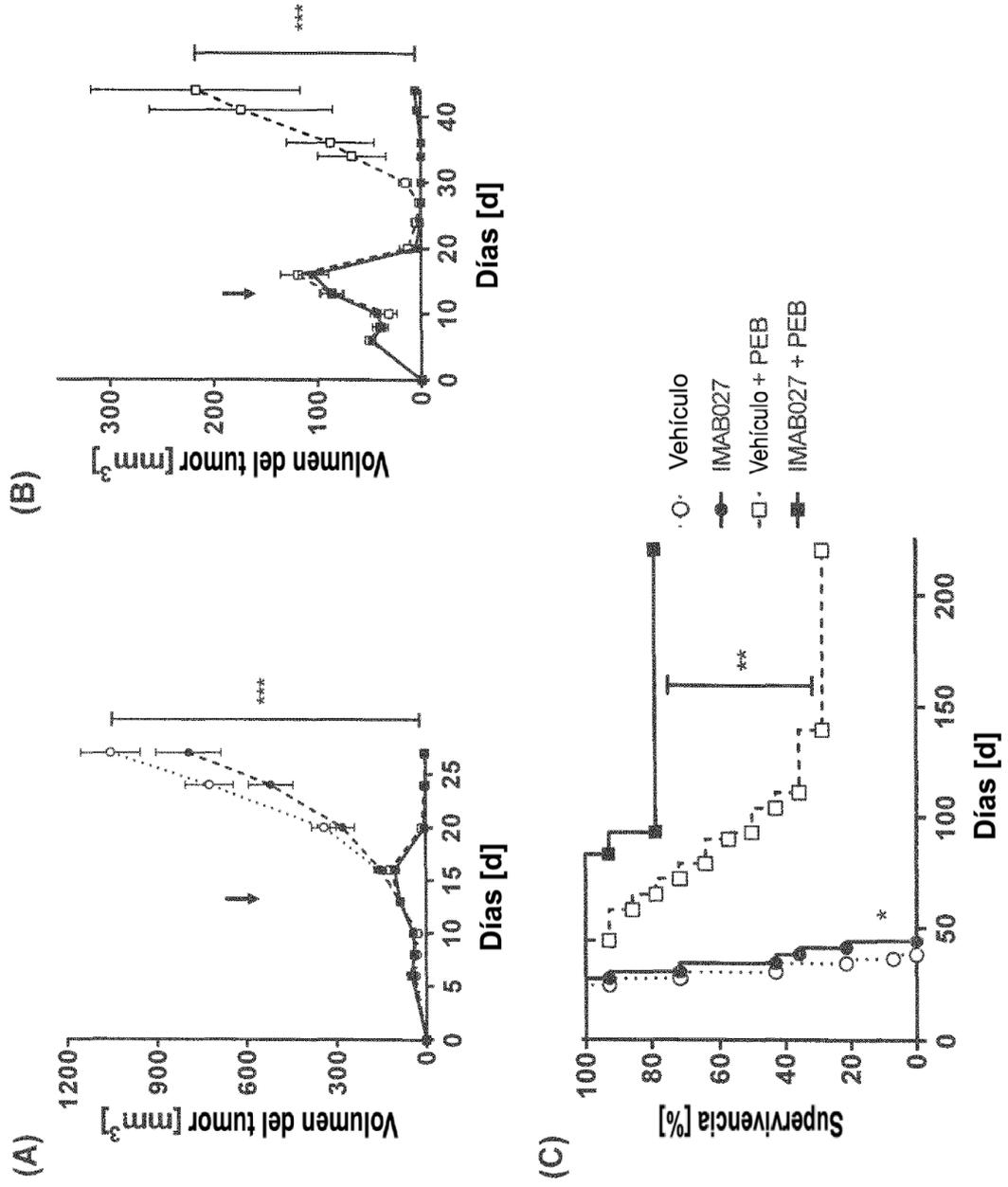


Figura 17

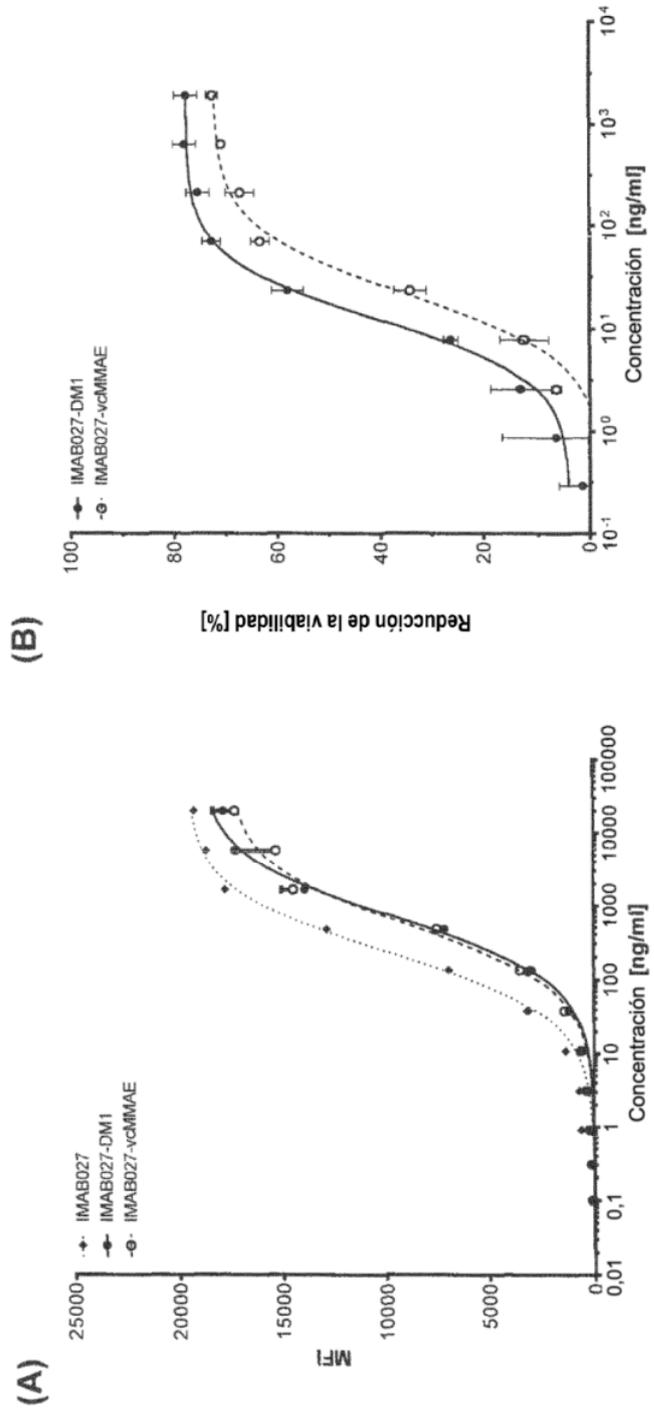


Figura 18

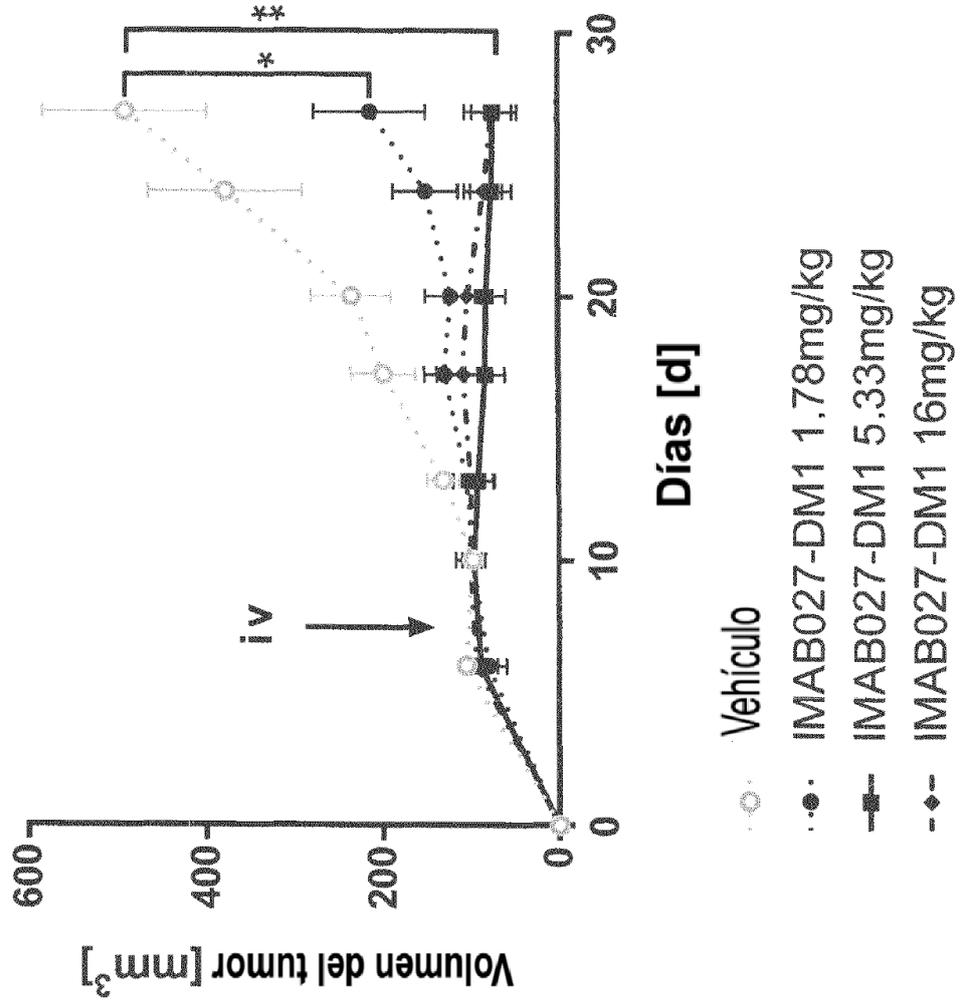


Figura 19

(A)

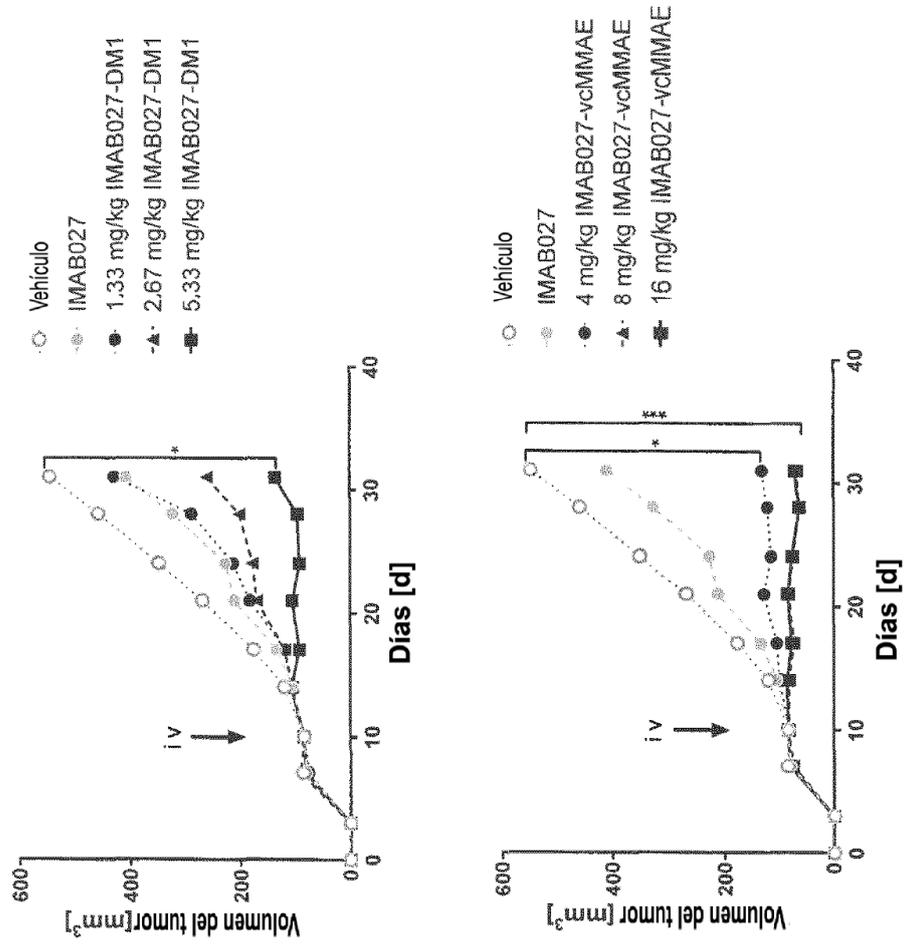


Figura 19

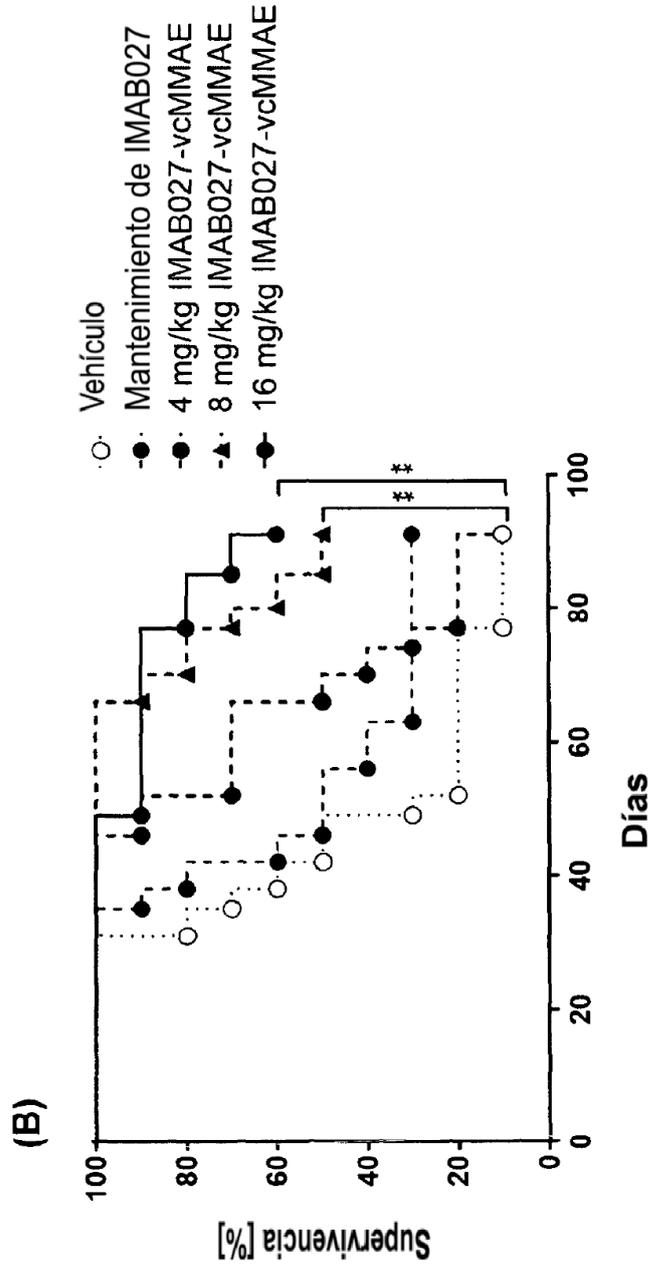


Figura 20

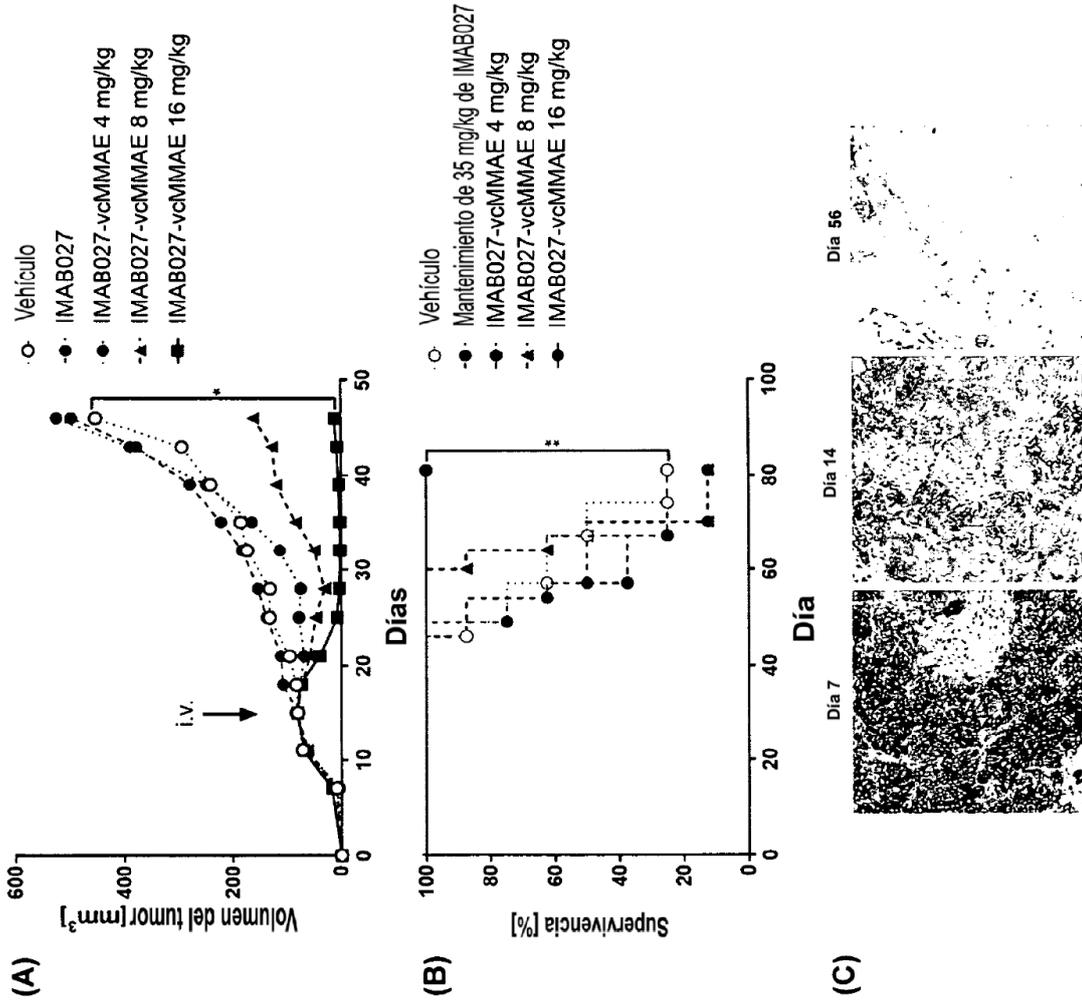


Figura 21

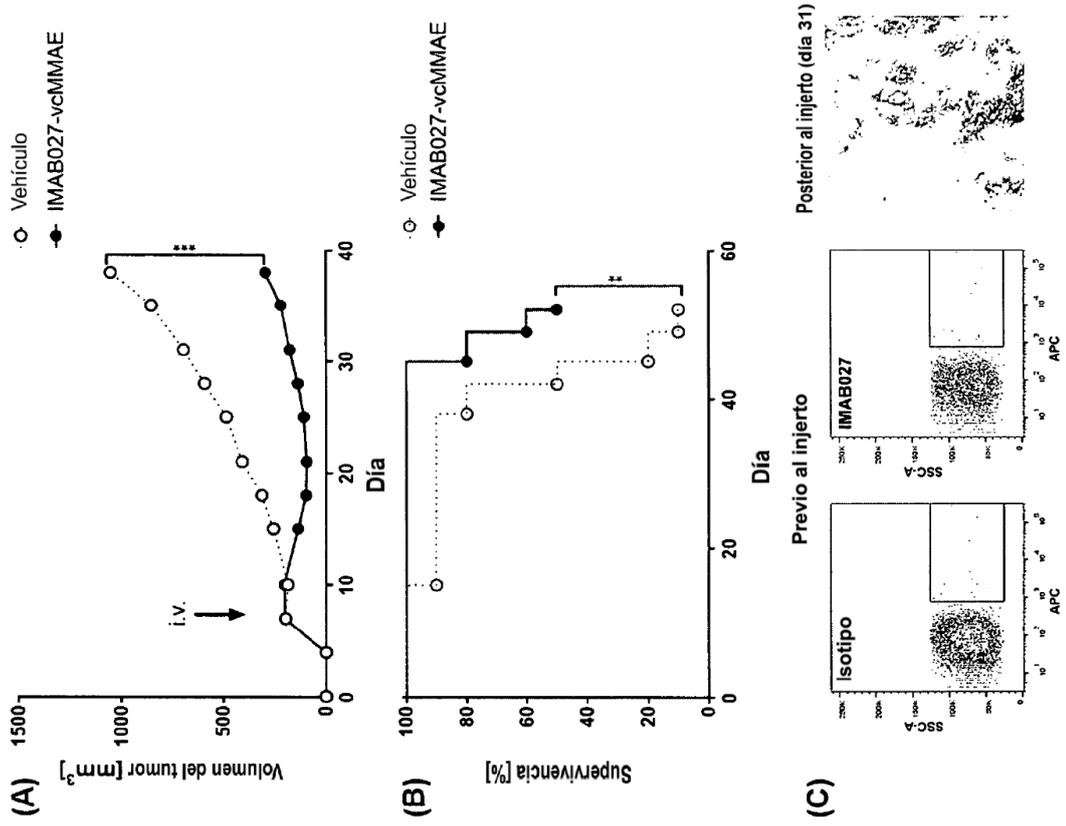
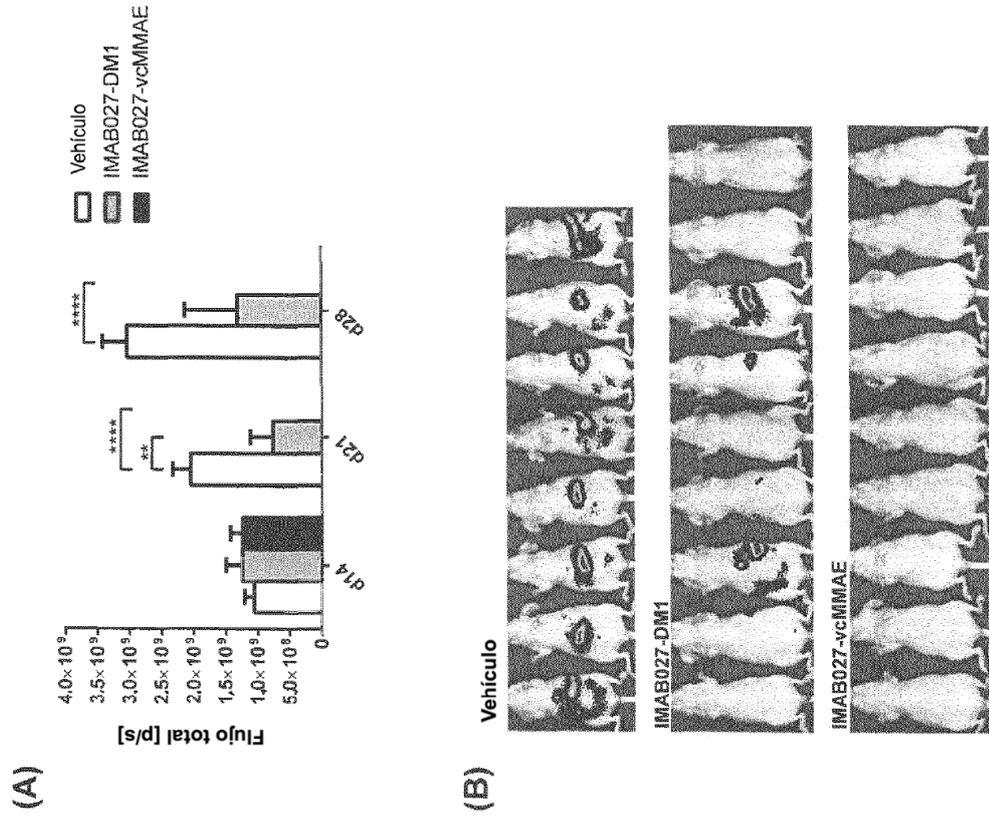


Figura 22



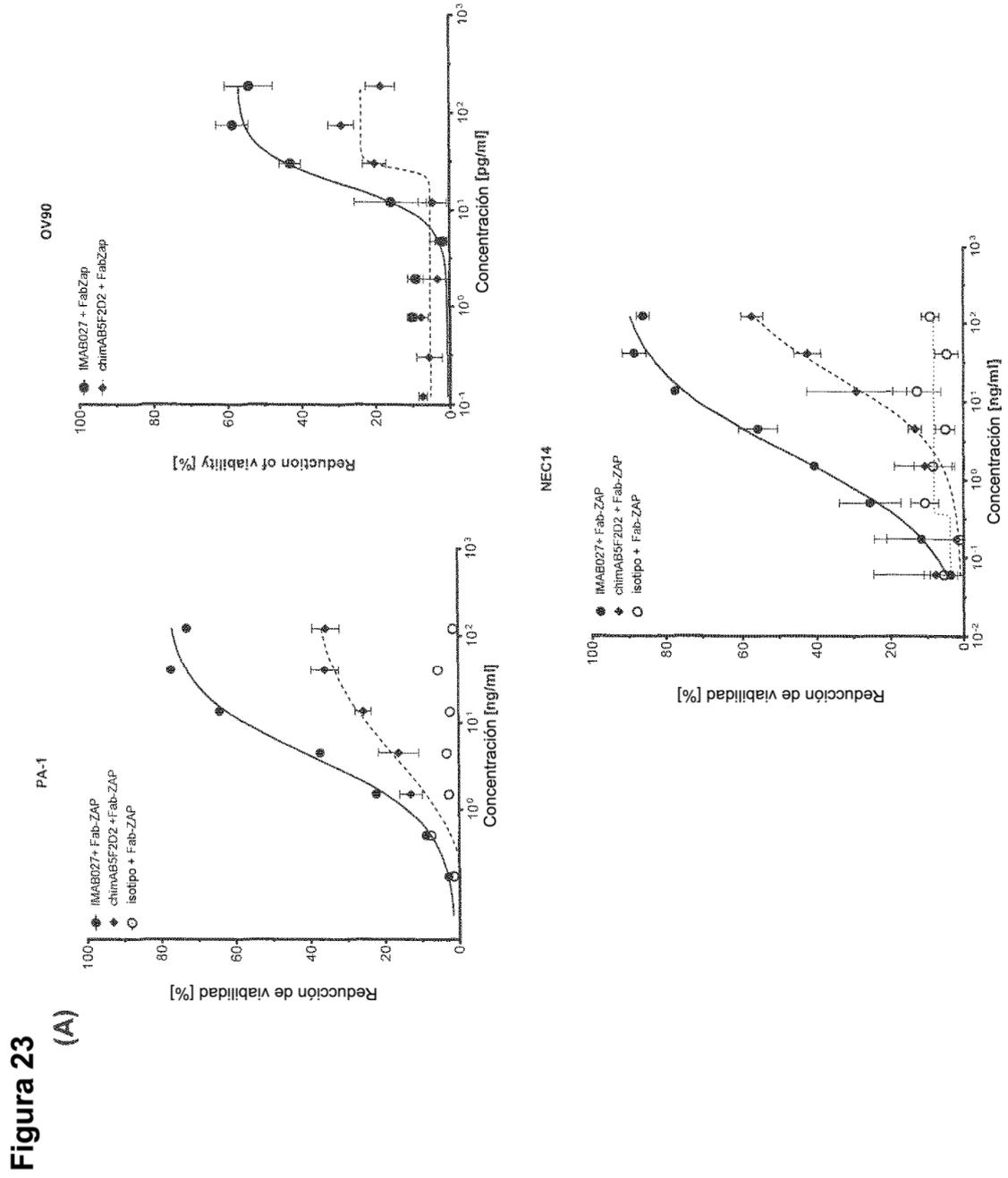


Figura 23

(B)

Nombre	PA-1		OV90		NEC14	
	EC50 relativa	máximo relativo	EC50 relativa	máximo relativo	EC50 relativa	máximo relativo
Unión de IMAB027	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Endocitosis de IMAB027	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Unión de chimAB5F2D2	92%	143%	69%	97%	80%	93%
Endocitosis de chimAB5F2D2	102%	50%	237%	39%	980%	71%