

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3254695 DAL TITOLO:

"Terapia di combinazione implicante anticorpi contro claudina 18.2 per il trattamento del cancro"

Depositata il:

\*\* \* \*\*

#### DESCRIZIONE

I cancri dello stomaco e dell'esofago (gastroesofagei; GE) sono tra le malattie maligne con il più alto bisogno medico non soddisfatto. Il cancro gastrico è la seconda causa principale di morte per cancro in tutto il mondo. L'incidenza del cancro esofageo è aumentata negli ultimi decenni, coincidente con una variazione del tipo istologico e della localizzazione del tumore primario. L'adenocarcinoma dell'esofago è ormai più diffuso rispetto al carcinoma a cellule squamose negli Stati Uniti e nell'Europa occidentale, con la maggior parte dei tumori situati nell'esofago distale. Il tasso complessivo di sopravvivenza a cinque anni per il cancro GE è del 20-25%, nonostante l'aggressività del trattamento standard stabilito associato a sostanziali effetti collaterali.

La maggior parte dei pazienti presenta malattie localmente avanzate o metastatiche e deve essere sottoposta ad una chemioterapia di prima linea. I regimi di trattamento sono basati su una struttura portante di derivati di platino e fluoropirimidina per lo più combinati con un terzo composto (ad esempio tassano o antracicline). Tuttavia, una sopravvivenza mediana senza progressione di 5 a 7 mesi e una sopravvivenza complessiva mediana di 9 a 11 mesi sono il miglior risultato che ci si possa aspettare.

La mancanza di un beneficio importante dai diversi regimi di chemioterapia di combinazione di più nuova generazione per questi cancri ha stimolato la ricerca sull'utilizzo di agenti mirati. Recentemente, per i cancri gastroesofagei Her2/neu-positivi è stato approvato Trastuzumab. Tuttavia, poiché solo circa il 20% dei pazienti esprime il bersaglio ed è idoneo per questo trattamento, il bisogno medico è ancora elevato.

Il documento della tecnica anteriore W02008/145338 prevede che una terapia combinata con un anticorpo e un agente citotossico possa essere giovevole per un paziente affetto da un cancro. Questo insegnamento, tuttavia, non stabilisce se l'agente chemioterapico venga trasportato o meno nella cellula tumorale e se il trattamento combinato offra o meno alcun beneficio per il paziente oltre a quello già ottenuto nella monoterapia. Altri documenti della tecnica anteriore come W02011/090005 descrivono il trattamento di pazienti affetti da un cancro del colon-retto con una combinazione di irinotecano e di un anticorpo contro A33, una proteina di membrana di tipo I e marcatore tumorale. Il documento della tecnica anteriore W02010/009794 descrive il trattamento di cellule cancerose esofagee-gastriche con anticorpi contro EGFR in combinazione con epirubicina, cisplatino e capecitabina. Il documento della tecnica anteriore Kobunai et al. 2011 (Anticancer Res. 31: 3691-3696) descrive l'utilizzo di

anticorpi diretti contro EGFR in combinazione con 5-FU.

La molecola delle giunzioni strette Claudina 18 variante di splicing 2 (Claudina 18.2 (CLDN18.2)) è un membro della famiglia claudina di proteine delle giunzioni strette. CLDN18.2 è una proteina transmembrana di 27,8 kDa comprendente quattro domini attraversanti la membrana con due piccoli loop extracellulari.

Nei tessuti normali non esiste alcuna espressione di CLDN18.2 rivelabile alla RT-PCR ad eccezione dello stomaco. L'immunostochimica con anticorpi specifici per CLDN18.2 rivela che lo stomaco è l'unico tessuto positivo.

CLDN18.2 è un antigene altamente selettivo della linea gastrica espresso esclusivamente su cellule epiteliali gastriche differenziate a vita breve.

CLDN18.2 viene mantenuto nel corso della trasformazione maligna e quindi frequentemente esposto sulla superficie di cellule umane di cancro gastrico. Inoltre, questo antigene pan-tumorale viene attivato ectopicamente a livelli significativi in adenocarcinomi esofagei, pancreatici e polmonari.

La proteina CLDN18.2 è localizzata anche nelle metastasi ai linfonodi di adenocarcinomi del cancro gastrico e in metastasi distanti soprattutto nelle ovaie (i cosiddetti tumori di Krukenberg).

L'anticorpo chimerico IgG1 IMAB362 diretto contro CLDN18.2 è stato sviluppato da Ganymed Pharmaceuticals AG. IMAB362 riconosce il primo dominio extracellulare (ECD1) di CLDN18.2 con affinità e specificità elevate. IMAB362 non si lega a nessun altro membro della famiglia claudina, inclusa la variante di splicing 1 strettamente correlata della Claudina 18 (CLDN18.1). IMAB362 mostra una precisa specificità per le cellule tumorali e associa quattro meccanismi di azione indipendenti estremamente potenti. Dopo il legame al bersaglio, IMAB362 media l'uccisione cellulare mediante ADCC, CDC e induzione di apoptosi indotte tramite reticolazione del bersaglio alla superficie della cellula tumorale e inibizione diretta della proliferazione. Quindi, IMAB362 effettua una lisi efficiente delle cellule CLDN18.2-positive, tra cui linee cellulari umane di cancro gastrico *in vitro* e *in vivo*. Topi portanti linee cellulari cancerose CLDN18.2-positive hanno un vantaggio di sopravvivenza e fino al 40% dei topi mostra regressione del tumore quando trattato con IMAB362.

Il profilo di tossicità e PK/TK di IMAB362 è stato accuratamente esaminato nei topi e nelle scimmie cynomolgus, il che ha incluso studi di ricerca degli intervalli di dosaggio, studi di tossicità a dosi ripetute di 28 giorni in cynomolgus e uno studio di tossicità a dosi ripetute di 3 mesi nei topi. Sia nei topi (durata di trattamento più lunga con somministrazione settimanale per 3 mesi, livelli massimi di dosaggio di 400 mg/kg) che nelle scimmie cynomolgus (fino a 5 applicazioni settimanali di fino a 100 mg/kg) dosi ripetute di IMAB362 i.v. sono ben tollerate. Non viene indotto alcun segno di tossicità sistemica o locale. Specificamente, in nessuno degli studi di tossicità è stata osservata alcuna tossicità gastrica. IMAB362 non induce attivazione immunitaria e rilascio di citochine. Non è stato registrato alcun effetto negativo sugli organi riproduttivi maschili o femminili. IMAB362

non si lega a tessuti privi del bersaglio. Studi di biodistribuzione nei topi indicano che la ragione della mancanza di tossicità gastrica è molto probabilmente rappresentata dalla compartimentalizzazione delle giunzioni strette a livello del sito luminale nell'epitelio gastrico sano, che sembra compromettere l'accessibilità dell'epitopo per IMAB362 in profondità. Questa compartimentazione viene persa in seguito a trasformazione maligna, rendendo l'epitopo sensibile all'effetto farmaceutico di IMAB362.

IMAB362 è nelle prime fasi di sperimentazione clinica. E' stato condotto uno studio clinico di fase I nell'uomo. 5 coorti di dosaggio (33 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup>, 300 mg/m<sup>2</sup>, 600 mg/m<sup>2</sup>, 1000 mg/m<sup>2</sup>) di 3 pazienti ciascuno hanno ricevuto una singola somministrazione endovenosa di IMAB362 e sono stati osservati per 28 giorni. IMAB362 è stato ben tollerato, senza alcuna osservazione rilevante sulla sicurezza nei pazienti. In un paziente, tutti i marcatori tumorali misurati sono diminuiti significativamente entro 4 settimane dal trattamento. In uno studio clinico di fase IIa in corso IMAB362 viene somministrato ripetutamente.

Qui presentiamo dati che dimostrano che agenti chemioterapici possono stabilizzare o aumentare l'espressione di CLDN18.2 sulla superficie delle cellule cancerose, causando una maggiore farmaco-sensibilità di CLDN18.2 ad un anticorpo anti-CLDN18.2 come IMAB362. È stato osservato un effetto sinergico di un anticorpo anti-CLDN18.2 come IMAB362 con particolari regimi chemioterapici, in particolare regimi chemioterapici utilizzati per il trattamento del cancro gastrico o per il trattamento di cancro solidi umani. Cellule cancerose umane pretrattate con la chemioterapia sono più suscettibili all'uccisione bersaglio-specifica indotta da anticorpo. In modelli tumorali di topo, il controllo tumorale con un anticorpo anti-CLDN18.2 più chemioterapia è superiore a quello con un anticorpo anti-CLDN18.2 come singolo agente.

Inoltre, i dati qui presentati indicano che i bisfosfonati come l'acido zoledronico (ZA), in particolare quando somministrati in combinazione con interleuchina-2 (IL-2) ricombinante, aumentano ulteriormente l'attività di un anticorpo anti-CLDN18.2 come IMAB362. Il meccanismo di base è rappresentato dall'attivazione e dall'espansione di una popolazione di cellule immunitarie altamente citotossica (cellule T  $\gamma\delta$ 2).

#### **SINTESI DELL'INVENZIONE**

La presente invenzione fornisce generalmente una terapia di combinazione per trattare e/o prevenire efficacemente malattie associate a cellule che esprimono CLDN18.2, ivi incluse malattie cancerose, quali il cancro gastrico, il cancro esofageo, il cancro pancreatico, il cancro polmonare quale il cancro polmonare non a cellule piccole (NSCLC), il cancro ovarico, il cancro del colon, il cancro epatico, il cancro della testa e del collo, e il cancro della cistifellea e loro metastasi, in particolare metastasi del cancro gastrico, quali i tumori di Krukenberg, metastasi peritoneali e metastasi ai linfonodi. Malattie cancerose particolarmente preferite sono gli adenocarcinomi dello stomaco, dell'esofago, del dotto pancreatico, dei dotti biliari, del polmone e dell'ovaia.

In un aspetto, il presente insegnamento fornisce un metodo per trattare o prevenire una malattia cancerosa, che prevede la somministrazione ad un paziente di un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 in combinazione con un agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2. L'espressione di CLDN18.2 è preferibilmente presente sulla superficie cellulare di una cellula cancerosa. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può essere somministrato prima, simultaneamente o dopo la somministrazione dell'anticorpo avente la capacità di legame a CLDN18.2, o una loro combinazione.

L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può essere un agente citotossico e/o citostatico. In una forma di realizzazione, l'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 comprende un agente che induce un arresto del ciclo cellulare o un accumulo di cellule in una o più fasi del ciclo cellulare, preferibilmente in una o più fasi del ciclo cellulare diverse dalla fase G1. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può comprendere un agente scelto dal gruppo consistente di antracicline, composti di platino, analoghi nucleosidici, tassani e analoghi della camptotecina, o loro pro-farmaci, e loro combinazioni. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può comprendere un agente scelto dal gruppo consistente di epirubicina, oxaliplatino, cisplatino, 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, come capecitabina, docetaxel, irinotecano e loro combinazioni. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può comprendere una combinazione di oxaliplatino e 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, una combinazione di cisplatino e 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, una combinazione di almeno una antraciclina e oxaliplatino, una combinazione di almeno una antraciclina e cisplatino, una combinazione di almeno una antraciclina e 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, una combinazione di almeno un tassano e oxaliplatino, una combinazione di almeno un tassano e cisplatino, una combinazione di almeno un tassano e 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, o una combinazione di almeno un analogo della camptotecina e 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può essere un agente che induce morte cellulare immunogenica. L'agente che induce la morte cellulare immunogenica può comprendere un agente scelto dal gruppo consistente di antracicline, oxaliplatino e loro combinazioni. L'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può comprendere una combinazione di epirubicina e oxaliplatino. In una forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione comprende la somministrazione di almeno una antraciclina, almeno un composto di platino e almeno uno tra 5-fluorouracile e suoi pro-farmaci. L'antraciclina può essere scelta dal gruppo consistente di epirubicina, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina e valrubicina. Preferibilmente, l'antraciclina è epirubicina. Il composto di platino può essere scelto dal gruppo consistente di oxaliplatino e cisplatino. L'analogo nucleosidico può essere scelto dal gruppo consistente di 5-fluorouracile e suoi pro-farmaci. Il tassano può essere scelto dal gruppo consistente di docetaxel e paclitaxel. L'analogo della camptotecina può essere scelto dal gruppo consistente di irinotecano e topotecano. In una forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione comprende la somministrazione di (i) epirubicina, oxaliplatino e 5-fluorouracile, (ii) epirubicina, oxaliplatino

e capecitabina, (iii) epirubicina, cisplatino e 5-fluorouracile, (iv) epirubicina, cisplatino e capecitabina, o (v) acido folinico, oxaliplatino e 5-fluorouracile.

In una forma di realizzazione, il metodo qui descritto comprende ulteriormente la somministrazione di un agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ . In una forma di realizzazione, le cellule T  $\gamma\delta$  sono cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. In una forma di realizzazione, l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  è un bisfosfonato, quale un bisfosfonato contenente azoto (aminobisfosfonato). In una forma di realizzazione, l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  è scelto dal gruppo consistente di acido zoledronico, acido clodronico, acido ibandronico, acido pamidronico, acido risedronico, acido minodronico, acido olpadronico, acido alendronico, acido incadronico e loro sali. In una forma di realizzazione, l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  viene somministrato in combinazione con interleuchina-2.

Il metodo qui descritto può inoltre comprendere la somministrazione di almeno un altro agente chemioterapico che può essere un agente citotossico. L'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 può legarsi a epitopi nativi di CLDN18.2 presenti sulla superficie di cellule vive. In una forma di realizzazione, l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 si lega al primo loop extracellulare di CLDN18.2. In una forma di realizzazione, l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 media la morte cellulare tramite una o più tra lisi mediata da citotossicità complemento-dipendente (CDC), lisi mediata da citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), induzione di apoptosi e inibizione della proliferazione. In una forma di realizzazione, l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo monoclonale, chimerico o umanizzato, o un frammento di un anticorpo. In una forma di realizzazione, l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo scelto dal gruppo consistente di (i) un anticorpo prodotto da e/o ottenibile da un clone depositato con il n. di accesso DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809 o DSM ACC2810, (ii) un anticorpo che è una forma chimerizzata o umanizzata dell'anticorpo di (i), (iii) un anticorpo avente la specificità dell'anticorpo di (i) e (iv) un anticorpo comprendente la porzione antigene-legante o il sito antigene-legante, in particolare la regione variabile, dell'anticorpo di (i) e preferibilmente avente la specificità dell'anticorpo di (i). In una forma di realizzazione, l'anticorpo è accoppiato ad un agente terapeutico, quale una tossina, un radioisotopo, un farmaco o un agente citotossico.

In una forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione comprende la somministrazione dell'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 a una dose fino a 1000 mg/m<sup>2</sup>. In una forma di realizzazione, il metodo dell'invenzione comprende la somministrazione dell'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 in maniera ripetuta a una dose di 300 a 600 mg/m<sup>2</sup>.

In una forma di realizzazione, il cancro è CLDN18.2-positivo. In una forma di realizzazione, la malattia cancerosa è scelta dal gruppo consistente di

cancro gastrico, cancro esofageo, cancro pancreatico, cancro del polmone, cancro ovarico, cancro del colon, cancro epatico, cancro della testa e del collo, cancro della cistifellea e loro metastasi. La malattia cancerosa può essere un tumore di Krukenberg, una metastasi peritoneale e/o una metastasi al linfonodo. In una forma di realizzazione, il cancro è un adenocarcinoma, in particolare un adenocarcinoma avanzato. In una forma di realizzazione, il cancro è scelto dal gruppo consistente di cancro dello stomaco, cancro dell'esofago, in particolare dell'esofago inferiore, cancro della giunzione esogastrica e cancro gastroesofageo. Il paziente può essere un paziente HER2/neu-negativo o un paziente positivo per HER2/neu ma non idoneo alla terapia con trastuzumab.

Secondo l'invenzione, CLDN18.2 ha preferibilmente la sequenza amminoacidica secondo SEQ ID NO: 1.

In un ulteriore aspetto, il presente insegnamento fornisce una preparazione medica comprendente un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 e un agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2. La preparazione medica del presente insegnamento può comprendere anche un agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ . L'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 e l'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 e, eventualmente, l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ , possono essere presenti nella preparazione medica in una miscela oppure possono essere separati l'uno dall'altro. La preparazione medica può essere un corredo che comprende un primo contenitore comprendente l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 e un contenitore comprendente l'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 e, eventualmente, un contenitore comprendente l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ . La preparazione medica può includere inoltre istruzioni stampate per l'utilizzo della preparazione per il trattamento del cancro, in particolare per l'utilizzo della preparazione in un metodo dell'invenzione. Diverse forme di realizzazione della preparazione medica e, in particolare, dell'agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 e dell'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  sono come descritte sopra per il metodo dell'insegnamento.

Il presente insegnamento fornisce anche gli agenti qui descritti, come l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 per utilizzo nei metodi qui descritti, p.es. per la somministrazione in combinazione con un agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 e, eventualmente, con un agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ .

Altre caratteristiche e altri vantaggi della presente invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

Figura 1. Effetto della chemioterapia su cellule cancerose gastriche. La coltivazione di cellule KatoIII per 96 ore porta ad un arresto del ciclo cellulare nella fase G0/G1 e alla sotto-regolazione di CLDN18.2. Composti citostatici che determinano un arresto del ciclo cellulare in diverse fasi del ciclo cellulare (fase S (5-FU) o fase G2 (epirubicina)) stabilizzano l'espressione CLDN18.2.

Figura 2. Effetto della chemioterapia su cellule cancerose gastriche. a/b: Effetto della chemioterapia a livello dei trascritti e delle proteine di CLDN18.2 nelle cellule cancerose gastriche. c: Citometria a flusso del legame extracellulare di IMAB362 a cellule cancerose gastriche trattate con agenti chemioterapici.

Figura 3. Effetto della chemioterapia su cellule cancerose gastriche. Composti citostatici che comportano un arresto del ciclo cellulare in diverse fasi del ciclo cellulare (fase S/G2 (Irinotecano) o fase G2 (Docetaxel)).

Figura 4. Uccisione ADCC-mediata indotta da IMAB362 di cellule cancerose gastriche in seguito a pretrattamento con agenti chemioterapici.

Figura 5. Effetto della chemioterapia su cellule cancerose gastriche. a: Cellule trattate con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino presentano un livello inferiore di cellule vive rispetto a cellule bersaglio coltivate con il terreno. b: L'espressione CLDN18.2 in cellule trattate con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino è maggiore che in cellule bersaglio coltivate con il terreno. c/d: Il trattamento delle cellule con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino aumenta la potenza di IMAB362 nell'indurre la ADCC.

Figura 6. Effetto della chemioterapia sulla CDC indotta da IMAB362.

Figura 7. Effetto della chemioterapia su cellule effettrici.

Figura 8. Espansione di PBMC in colture integrate con ZA/IL-2.

Figura 9. Arricchimento di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 in colture di PBMC integrate con ZA/IL-2.

Figura 10. Arricchimento di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 in terreno integrato con ZA e con una dose crescente di IL-2.

Figura 11. Espansione e attività citotossica di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 in seguito a co-incubazione con monociti pulsati con ZA e con cellule cancerose umane.

Figura 12. Sviluppo ZA-dipendente di differenti tipi cellulari in colture di PBMC.

Figura 13. Esposizione di marcatori di superficie su cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 in seguito a trattamento con ZA/IL-2.

Figura 14. Attività ADCC di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 con IMAB362 su cellule cancerose gastriche NUGC-4 CLDN18.2-positive.

Figura 15. ADCC di IMAB362 con utilizzo di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 come cellule effettrici.

Figura 16. Effetti di ZA sulla localizzazione in superficie di CLDN18.2 su cellule bersaglio.

Figura 17. Effetti della chemioterapia e del trattamento con ZA/IL-2 su cellule effettrici.

Figura 18. Studi di biodistribuzione con anticorpi coniugati nei topi.

Figura 19. Trattamento precoce di xeno-trapianti tumorali di HEK293-CLDN18.2.

Figura 20. Trattamento di xeno-trapianti tumorali di HEK293~CLDN18.2 avanzati.

Figura 21. Effetto di IMAB362 sulla crescita tumorale sottocutanea di xeno-trapianti di cancro gastrico.

Figura 22. Effetti dell'immunoterapia con IMAB362 su xeno-trapianti di carcinoma gastrico NCI-N87~CLDN18.2.

Figura 23. Effetti della terapia di combinazione con un regime di IMAB362 ed EOF su xeno-trapianti di NCI-N87~CLDN18.2.

Figura 24. Effetti della terapia di combinazione con un regime di IMAB362 ed EOF su xeno-trapianti di NUGC-4~CLDN18.2.

Figura 25. Effetto di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ZA/IL-2 indotte sul controllo di tumori macroscopici da parte di IMAB362 in topi NSG.

Figura 26. Effetti della terapia di combinazione con un regime di IMAB362 ed EOF su allo-trapianti di tumori CLS-103~CLDN18.2.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Anche se il presente insegnamento è descritto nei dettagli in seguito, è da intendersi che questo insegnamento non è limitato alle/ai particolari metodologie, protocolli e reagenti descritte/i nel presente documento, poiché queste/i possono variare. E' inoltre da intendersi che la terminologia qui utilizzata serve unicamente a descrivere particolari forme di realizzazione e che con essa non si intende limitare la portata del presente insegnamento che sarà esclusivamente limitato dalle rivendicazioni allegate. Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati in questo documento hanno gli stessi significati comunemente intesi da un normale tecnico del ramo.

Nel seguito saranno descritti gli elementi del presente insegnamento. Questi elementi sono elencati con forme di realizzazione specifiche, comunque è da intendersi che esse possono essere combinate in qualsiasi modo e in qualsiasi numero per creare ulteriori forme di realizzazione.

Preferibilmente, i termini qui utilizzati sono definiti come descritto in "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Svizzera, (1995).

La pratica del presente insegnamento impiegherà, se non diversamente indicato, metodi convenzionali di chimica, biochimica, biologia cellulare, immunologia e tecniche del DNA ricombinante che sono spiegate nella letteratura del settore (cfr. p.es., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Edizione, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

Nel corso di questa descrizione e delle rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto non imponga diversamente, con la parola "comprendere" e variazioni come "comprende" e "comprendente", si intende implicare l'inclusione di un determinato membro, numero intero o step o di un determinato gruppo di membri, numeri interi o step, ma non l'esclusione di alcun altro membro, numero intero o step o gruppo di membri, numeri interi o step, sebbene in alcune forme di realizzazione tale altro membro, numero intero o step o gruppo di membri, numeri interi o step possa essere escluso, cioè l'oggetto consiste nell'inclusione di un determinato membro, numero intero o step o gruppo di membri, numeri interi o step. I termini



“un/uno/una” e “il/lo/la” e riferimenti simili utilizzati nel contesto della descrizione dell'invenzione (in particolare nel contesto delle rivendicazioni) devono essere considerati comprendere sia il singolare che il plurale, a meno che non sia qui indicato diversamente o chiaramente contraddetto dal contesto. L'elencazione nella presente di intervalli di valori è unicamente intesa fungere da metodo stenografico per indicare singolarmente ciascun valore separato che rientra nell'intervallo. Salvo qui diversamente indicato, ogni singolo valore è incorporato nella descrizione come se fosse qui specificamente elencato. Tutti i metodi qui descritti possono essere eseguiti in qualsiasi ordine appropriato, a meno che non sia qui indicato diversamente o chiaramente contraddetto dal contesto. Con l'utilizzo di qualsiasi e di tutti gli esempi o locuzioni esemplificative (p.e., "quale/i") qui forniti si intende solo illustrare meglio l'invenzione. Nessun linguaggio nella descrizione dovrebbe essere interpretato come indicante qualsiasi elemento non rivendicato essenziale per la pratica dell'invenzione.

Il termine “CLDN18” si riferisce a claudina 18 e include qualsiasi variante, tra cui la variante di splicing 1 della claudina 18 (claudina 18.1 (CLDN18.1)) e la variante di splicing 2 della claudina 18 (claudina 18.2 (CLDN18.2)).

Il termine “CLDN18.2” si riferisce preferibilmente a CLDN18.2 umana e, in particolare, ad una proteina comprendente, preferibilmente consistente della sequenza amminoacidica secondo SEQ ID NO: 1 dell'elenco delle sequenze o di una variante di detta sequenza amminoacidica.

Il termine “CLDN18.1” si riferisce preferibilmente a CLDN18.1 umana e, in particolare, ad una proteina comprendente, preferibilmente consistente della sequenza amminoacidica secondo SEQ ID NO: 2 dell'elenco delle sequenze o di una variante di detta sequenza amminoacidica.

Il termine "variante" secondo l'invenzione si riferisce, in particolare, a mutanti, varianti di splicing, conformazioni, isoforme, varianti alleliche, varianti di specie e omologhi di specie, in particolare quelle che sono presenti in natura. Una variante allelica si riferisce ad un'alterazione della normale sequenza di un gene, il cui significato è spesso poco chiaro. Il sequenziamento genico completo identifica spesso numerose varianti alleliche di un determinato gene. Un omologo di specie è una sequenza di acido nucleico o di aminoacidi con una specie di origine diversa da quella di una determinata sequenza di acido nucleico o di aminoacidi. Il termine "variante" comprende tutte le varianti modificate post-traduzionalmente e le varianti di conformazione.

Secondo l'insegnamento, il termine “cancro CLDN18.2-positivo” significa un cancro implicante cellule cancerose esprimenti CLDN18.2, preferibilmente sulla superficie delle cellule cancerose stesse.

“Superficie cellulare” è utilizzata secondo il significato normale per essa nell'arte e quindi include l'esterno della cellula che è accessibile al legame da parte di proteine e di altre molecole.

CLDN18.2 è espressa sulla superficie delle cellule se localizzata a livello della superficie di dette cellule ed è accessibile al legame da parte di anticorpi

CLDN18.2-specifici aggiunti alle cellule.

Secondo l'insegnamento, CLDN18.2 non è sostanzialmente espressa in una cellula se il livello di espressione è più basso rispetto all'espressione presente nelle cellule dello stomaco o nel tessuto dello stomaco. Preferibilmente, il livello di espressione è inferiore al 10%, preferibilmente inferiore al 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% o 0,05% dell'espressione nelle cellule dello stomaco o nel tessuto dello stomaco o addirittura inferiore. Preferibilmente, CLDN18.2 non è sostanzialmente espressa in una cellula se il livello di espressione supera il livello di espressione in tessuto non canceroso diverso dallo stomaco di non più di 2 volte, preferibilmente 1,5 volte e preferibilmente se non supera il livello di espressione in detto tessuto non canceroso. Preferibilmente, CLDN18.2 non è sostanzialmente espressa in una cellula se il livello di espressione è al di sotto del limite di rivelazione e/o se il livello di espressione è troppo basso per consentire il legame da parte di anticorpi CLDN18.2-specifici aggiunti alle cellule.

Secondo l'insegnamento, CLDN18.2 è espressa in una cellula se il livello di espressione supera il livello di espressione in tessuto non canceroso diverso dallo stomaco preferibilmente di più di 2 volte, preferibilmente di 10 volte, di 100 volte, di 1000 volte, o di 10000 volte. Preferibilmente, CLDN18.2 è espressa in una cellula se il livello di espressione è al di sopra del limite di rivelazione e/o se il livello di espressione è abbastanza elevato da consentire il legame da parte di anticorpi CLDN18.2-specifici aggiunti alle cellule. Preferibilmente, CLDN18.2 espressa in una cellula è espressa o esposta sulla superficie di detta cellula.

Secondo l'insegnamento, il termine "malattia" si riferisce a qualsiasi stato patologico, compreso il cancro, in particolare quelle forme di cancro descritte nel presente documento. Qualsiasi presente riferimento al cancro o a particolari forme di cancro include anche loro metastasi cancerose. In una forma di realizzazione preferita, una malattia da trattare secondo la presente domanda coinvolge cellule che esprimono CLDN18.2.

"Malattie associate a cellule che esprimono CLDN18.2" o espressioni analoghe significano secondo l'invenzione che CLDN18.2 è espressa in cellule di un tessuto o organo malato. In una forma di realizzazione, l'espressione di CLDN18.2 nelle cellule di un tessuto o organo malato è aumentata rispetto allo stato in un tessuto o organo sano. Un aumento si riferisce ad un aumento di almeno il 10%, in particolare di almeno il 20%, almeno il 50%, almeno il 100%, almeno il 200%, almeno il 500%, almeno il 1000%, almeno il 10000% o addirittura di più. In una forma di realizzazione, l'espressione si osserva solo in un tessuto malato, mentre l'espressione in un tessuto sano è repressa. Secondo l'invenzione, malattie associate a cellule che esprimono CLDN18.2 includono malattie cancerose. Inoltre, secondo l'invenzione, le malattie cancerose sono preferibilmente quelle in cui le cellule cancerose esprimono CLDN18.2.

Come qui utilizzata/o, "malattia cancerosa" o "cancro" comprende una malattia caratterizzata da crescita cellulare, proliferazione, differenziazione, adesione e/o migrazione regolata in maniera aberrante. Con "cellula cancerosa" si intende una cellula anormale che cresce mediante una proliferazione

cellulare rapida e incontrollata e che continua a crescere dopo la cessazione degli stimoli che hanno innescato la nuova crescita. Preferibilmente, una "malattia cancerosa" è caratterizzata da cellule che esprimono CLDN18.2 e una cellula cancerosa esprime CLDN18.2. Una cellula che esprime CLDN18.2 è preferibilmente una cellula cancerosa, preferibilmente dei cancri qui descritti.

"Adenocarcinoma" è un cancro che nasce dal tessuto ghiandolare. Questo tessuto è anche parte di una categoria tissutale più grande conosciuta come tessuto epiteliale. Il tessuto epiteliale comprende la pelle, le ghiandole e una varietà di altri tessuti che rivestono le cavità e gli organi del corpo. L'epitelio deriva embrionalmente da ectoderma, endoderma e mesoderma. Per essere classificate come adenocarcinoma, non è necessario che le cellule siano parte di una ghiandola, purché abbiano proprietà secretorie. Questa forma di carcinoma può presentarsi in alcuni mammiferi superiori, compresi gli esseri umani. Gli adenocarcinomi ben differenziati tendono ad assomigliare al tessuto ghiandolare da cui derivano, mentre quelli scarsamente differenziati possono non assomigliarvi. Mediante colorazione delle cellule di una biopsia, un patologo determinerà se il tumore è un adenocarcinoma o qualche altro tipo di cancro. Gli adenocarcinomi possono manifestarsi in molti tessuti del corpo a causa della natura onnipresente delle ghiandole all'interno del corpo. Anche se ciascuna ghiandola potrebbe non secernere la stessa sostanza, fintanto che esiste una funzione esocrina rispetto alla cellula, essa è considerata ghiandolare e la sua forma maligna è dunque denominata adenocarcinoma. Gli adenocarcinomi maligni invadono altri tessuti e spesso formano delle metastasi se hanno abbastanza tempo per farlo. L'adenocarcinoma ovarico è il tipo più comune di carcinoma ovarico. Esso include gli adenocarcinomi sierosi e mucinosi, l'adenocarcinoma delle cellule chiare e l'adenocarcinoma endometriode.

Con "metastasi" si intende la diffusione di cellule cancerose dal loro sito originale ad un'altra parte del corpo. La formazione di metastasi è un processo molto complesso e dipende dal distacco di cellule maligne dal tumore primario, dall'invasione della matrice extracellulare, dalla penetrazione delle membrane basali endoteliali per l'entrata nelle cavità del corpo e nei vasi, e poi, dopo il trasporto da parte del sangue, dall'infiltrazione in organi bersaglio. Infine, la crescita di un nuovo tumore nel sito bersaglio dipende dall'angiogenesi. La metastasi tumorale si verifica spesso anche dopo la rimozione del tumore primario in quanto cellule o componenti tumorali possono rimanere e sviluppare potenzialità metastatiche. In una forma di realizzazione, il termine "metastasi" secondo l'invenzione si riferisce a "metastasi distante" che si riferisce ad una metastasi che è distante dal tumore primario e dal sistema linfonodale regionale. In una forma di realizzazione, il termine "metastasi" secondo l'invenzione riguarda metastasi linfonodali. Una particolare forma di metastasi che è trattabile con la terapia dell'invenzione è una metastasi originaria di un cancro gastrico come sito primario. In forme di realizzazione preferite, tali metastasi del cancro gastrico sono tumori di Krukenberg, metastasi peritoneali e/o metastasi linfonodali.

Il tumore di Krukenberg è un tumore metastatico non comune dell'ovaia che rappresenta l'1% al 2% di tutti i tumori ovarici. La prognosi del tumore di Krukenberg è ancora molto infausta e non esiste alcun trattamento stabilito per i tumori di Krukenberg. Il tumore di Krukenberg è un

adenocarcinoma metastatico a cellule ad anello con castone dell'ovaia. Lo stomaco è il sito primario della maggior parte dei tumori di Krukenberg (70%). I carcinomi di colon, appendice e mammella (soprattutto il carcinoma lobulare invasivo) sono i secondi siti primari più comuni. Sono stati riportati casi rari di tumori di Krukenberg provenienti da carcinomi della cistifellea, del tratto biliare, del pancreas, dell'intestino tenue, dell'ampolla di Vater, della cervice e della/del vescica urinaria/uraco. L'intervallo tra la diagnosi di un carcinoma primario e la successiva scoperta di un coinvolgimento ovarico è solitamente di 6 mesi o meno, ma sono stati riportati periodi più lunghi. In molti casi, il tumore primario è molto piccolo e può sfuggire alla rivelazione. Un'anamnesi di un carcinoma precedente dello stomaco o di un altro organo può essere ottenuta solo nel 20% al 30% dei casi.

Il tumore di Krukenberg è un esempio della diffusione selettiva dei cancri, più comunemente nell'asse stomaco-ovaia. Questo asse di diffusione cancerosa ha storicamente attirato l'attenzione di molti patologi, specialmente quando si è constatato che i neoplasm gastrici metastatizzano selettivamente nelle ovaie senza coinvolgimento di altri tessuti. Il percorso di metastasi del carcinoma gastrico alle ovaie è stato un mistero per molto tempo, ma è ormai evidente che la diffusione linfatica retrograda sia la via più probabile della metastasi.

Le donne con tumori di Krukenberg tendono ad essere insolitamente giovani come pazienti con carcinoma metastatico in quanto sono tipicamente nel quinto decennio della loro vita, con un'età media di 45 anni. Questa distribuzione nella giovane età può essere in parte correlata all'aumento della frequenza dei carcinomi gastrici a cellule ad anello con castone nelle donne giovani. I sintomi che si manifestano comunemente sono di solito legati al coinvolgimento ovarico, i più comuni dei quali sono dolori e distensione addominali (principalmente a causa delle masse ovariche generalmente bilaterali e spesso grandi). I pazienti rimanenti hanno sintomi gastrointestinali non specifici oppure sono asintomatici. Inoltre, è stato riscontrato che il tumore di Krukenberg è associato alla virilizzazione derivante dalla produzione di ormoni da parte dello stroma ovarico. Nel 50% dei casi è presente un'ascite che di solito rivela cellule maligne.

I tumori di Krukenberg sono bilaterali in oltre l'80% dei casi segnalati. Le ovaie sono solitamente asimmetricamente ingrossate, con un profilo con protuberanze. Le superfici sezionate sono gialle o bianche; sono di solito solide, anche se sono talvolta cistiche. E' importante notare che la superficie capsulare delle ovaie con tumori di Krukenberg è tipicamente liscia e priva di adesioni o di depositi peritoneali. Da notare, altri tumori metastatici all'ovaia tendono ad essere associati a impianti di superficie. Questo può spiegare perché la morfologia macroscopica del tumore di Krukenberg possa apparire ingannevolmente come un tumore ovarico primario. Tuttavia, il bilateralismo nel tumore di Krukenberg è coerente con la sua natura metastatica.

I pazienti con tumori di Krukenberg hanno un tasso complessivo di mortalità significativamente elevato. La maggior parte dei pazienti muore entro

2 anni (sopravvivenza media, 14 mesi). Diversi studi dimostrano che la prognosi è infausta quando il tumore primario viene identificato dopo la scoperta della metastasi all'ovaia e la prognosi peggiora se il tumore primario rimane nascosto.

Non è stata chiaramente stabilita nella letteratura alcuna strategia di trattamento ottimale per i tumori di Krukenberg. Non è stata adeguatamente affrontata la questione del fatto che debba essere eseguita o meno una resezione chirurgica. La chemioterapia o la radioterapia non ha alcun effetto significativo sulla prognosi di pazienti con tumori di Krukenberg.

Con "trattare" si intende somministrare un composto o una composizione o una combinazione di composti o di composizioni ad un soggetto al fine di prevenire o eliminare una malattia, compresa la riduzione delle dimensioni di un tumore o del numero di tumori in un soggetto; arrestare o rallentare una malattia in un soggetto; inibire o rallentare lo sviluppo di una nuova malattia in un soggetto; diminuire la frequenza o la gravità dei sintomi e/o delle recidive in un soggetto che ha attualmente o ha precedentemente avuto una malattia; e/o prolungare, vale a dire aumentare la durata di vita del soggetto.

In particolare, il termine "trattamento di una malattia" comprende la cura, la riduzione della durata, il miglioramento, la prevenzione, il rallentamento o l'inibizione della progressione o del peggioramento, o la prevenzione o il ritardo dell'insorgenza di una malattia o dei suoi sintomi.

Il termine "paziente" indica, secondo l'invenzione, un soggetto di trattamento, in particolare un soggetto malato, compresi esseri umani, primati non umani o altri animali, in particolare mammiferi, quali mucche, cavalli, suini, pecore, capre, cani, gatti o roditori, quali topi e ratti. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, un paziente è un essere umano.

Il termine "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" si riferisce ad un agente o ad una combinazione di agenti la cui fornitura alle cellule determina un aumento dei livelli di RNA e/o proteine di CLDN18.2, preferibilmente un aumento dei livelli della proteina CLDN18.2 sulla superficie cellulare, rispetto alla situazione in cui alle cellule non viene fornito/a l'agente o la combinazione di agenti. Preferibilmente, la cellula è una cellula cancerosa, in particolare una cellula cancerosa che esprime CLDN18.2, come una cellula dei tipi di cancro descritti in questo documento.

Il termine "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" si riferisce, in particolare, ad un agente o ad una combinazione di agenti la cui fornitura alle cellule causa una densità superiore di CLDN18.2 sulla superficie di dette cellule rispetto alla situazione in cui alle cellule non viene fornito/a l'agente o la combinazione di agenti. "Stabilizza l'espressione di CLDN18.2" include, in particolare, la situazione in cui l'agente o la combinazione di agenti impedisce una diminuzione o riduce una diminuzione dell'espressione di CLDN18.2, p.es. l'espressione di CLDN18.2 diminuirebbe senza fornire l'agente o la combinazione di agenti e la fornitura dell'agente o della combinazione di agenti impedisce tale diminuzione o riduce detta diminuzione dell'espressione di CLDN18.2. "Aumenta l'espressione di CLDN18.2" include, in particolare, la situazione in cui l'agente

o la combinazione di agenti aumenta l'espressione di CLDN18.2, p.es. l'espressione di CLDN18.2 diminuirebbe, rimarrebbe sostanzialmente costante o aumenterebbe senza fornire l'agente o la combinazione di agenti e la fornitura dell'agente o della combinazione di agenti aumenta l'espressione di CLDN18.2 rispetto alla situazione dell'assenza di fornitura dell'agente o della combinazione di agenti, in modo che l'espressione risultante sia più elevata rispetto alla situazione in cui l'espressione di CLDN18.2 diminuirebbe, rimarrebbe sostanzialmente costante o aumenterebbe senza fornire l'agente o la combinazione di agenti.

Il termine "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" include agenti chemioterapici o combinazioni di agenti chemioterapici, quali agenti citostatici. Gli agenti chemioterapici possono influenzare le cellule in uno dei seguenti modi: (1) Danneggiare il DNA delle cellule in modo che non si possano più riprodurre, (2) Inibire la sintesi di nuovi filamenti di DNA in modo che non sia possibile alcuna replicazione cellulare, (3) Arrestare i processi mitotici delle cellule in modo che le cellule non possano dividersi in due cellule.

Il termine "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" si riferisce preferibilmente a un agente o ad una combinazione di agenti, quali un composto citostatico o una combinazione di composti citostatici, la cui fornitura alle cellule, in particolare a cellule cancerose, determina l'arresto o l'accumulo delle cellule in una o più fasi del ciclo cellulare, preferibilmente in una o più fasi del ciclo cellulare diverse dalle fasi G1 e G0, preferibilmente diverse dalla fase G1, preferibilmente in una o più delle fasi G2 o S del ciclo cellulare, quali le fasi G1/G2, S/G2, G2 o S del ciclo cellulare. Il termine "cellule che si arrestano o si accumulano in una o più fasi del ciclo cellulare" significa che la percentuale di cellule che è in dette una o più fasi del ciclo cellulare aumenta. Ogni cellula passa attraverso un ciclo composto da quattro fasi per replicarsi. La prima fase denominata G1 è la fase in cui la cellula si prepara a replicare i propri cromosomi. La seconda fase è denominata S, e in questa fase si verifica la sintesi del DNA e il DNA viene duplicato. La fase successiva è la fase G2, quando l'RNA e le proteine si duplicano. La fase finale è la fase M, che è la fase dell'effettiva divisione cellulare. In questa fase finale, il DNA e l'RNA duplicati si dividono e si spostano verso estremità separate della cellula, e la cellula effettivamente si divide in due cellule identiche e funzionali. Agenti chemioterapici che sono agenti che danneggiano il DNA di solito comportano un accumulo delle cellule nella fase G1 e/o G2. Agenti chemioterapici che bloccano la crescita cellulare interferendo con la sintesi del DNA, come gli antimetaboliti, di solito provocano un accumulo delle cellule nella fase S. Esempi di questi farmaci sono 6-mercaptopurina e 5-fluorouracile.

Il termine "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" include antracicline, come epirubicina, composti di platino, quali oxaliplatino e cisplatino, analoghi nucleosidici, quali 5-fluorouracile o suoi pro-farmaci, tassani come docetaxel, e analoghi della camptotecina, quali irinotecano e topotecano, e combinazioni di farmaci, quali combinazioni di farmaci comprendenti una o più tra antracicline come epirubicina, oxaliplatino e 5-fluorouracile, quale una combinazione di farmaci comprendenti oxaliplatino e 5-fluorouracile o altre combinazioni di farmaci descritte nel presente

documento.

In una forma di realizzazione preferita, un "agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2" è un "agente che induce morte cellulare immunogenica".

In circostanze specifiche, le cellule cancerose possono entrare in una via di stress letale legata all'emissione di una combinazione spaziotemporalmente definita di segnali decodificata dal sistema immunitario per attivare risposte immunitarie tumore-specifiche (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798-804). In questo scenario, le cellule cancerose vengono indotte a emettere segnali che vengono rilevati da effettori immunitari innati, come le cellule dendritiche, per innescare una risposta immunitaria associata che coinvolge cellule T CD8+ e la segnalazione di IFN- $\gamma$  in modo che la morte delle cellule tumorali possa suscitare una risposta immunitaria anticancro produttiva. Questi segnali includono l'esposizione pre-apoptica dello chaperon calreticulina (CRT) del reticolo endoplasmatico (ER) a livello della superficie cellulare, la secrezione pre-apoptica di ATP ed il rilascio post-apoptico della proteina nucleare HMGB1. Collettivamente, questi processi costituiscono i determinanti molecolari della morte cellulare immunogenica (ICD). Le antracicline, l'oxaliplatino e l'irraggiamento  $\gamma$  sono in grado di indurre tutti i segnali che definiscono l'ICD, mentre il cisplatino, ad esempio, che è insufficiente nell'indurre la traslocazione di CRT dall'ER alla superficie delle cellule morenti - un processo che richiede lo stress dell'ER - necessita della complementazione da parte di taspigargina, un induttore di stress dell'ER.

Il termine "agente che induce morte cellulare immunogenica" si riferisce ad un agente o ad una combinazione di agenti che, quando fornito/a alle cellule, in particolare alle cellule cancerose, è in grado di indurre le cellule ad entrare in una via di stress letale che, infine, produce risposte immunitarie tumore-specifiche. In particolare, un agente che induce morte cellulare immunogenica, quando viene fornito alle cellule, induce le cellule a emettere una combinazione spaziotemporalmente definita di segnali, tra cui in particolare l'esposizione pre-apoptica dello chaperon calreticulina (CRT) del reticolo endoplasmatico (ER) a livello della superficie cellulare, la secrezione pre-apoptica di ATP ed il rilascio post-apoptico della proteina nucleare HMGB1.

Il termine "agente che induce morte cellulare immunogenica" include antracicline e oxaliplatino.

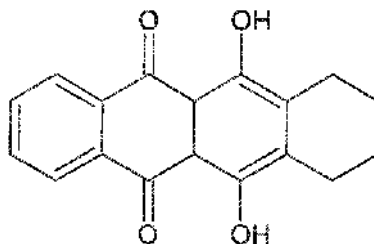
Le antracicline sono una classe di farmaci comunemente utilizzati nella chemioterapia contro il cancro, che sono anche antibiotici. Strutturalmente, tutte le antracicline condividono una struttura comune a quattro anelli di 7,8,9,10-tetraidrotetracen-5,12-chinone e solitamente richiedono la glicosilazione a livello di siti specifici.

Le antracicline favoriscono preferibilmente uno o più dei seguenti meccanismi di azione: 1. Inibizione della sintesi di DNA e RNA mediante intercalazione tra paia di basi del filamento di DNA/RNA, con impedimento conseguente della replicazione di cellule cancerose in rapida crescita. 2.

Inibizione dell'enzima topoisomerasi II, con prevenzione del rilassamento del DNA super-avvolto e pertanto blocco della trascrizione e della replicazione del DNA. 3. Creazione di radicali liberi di ossigeno mediati dal ferro che danneggiano il DNA e le membrane cellulari.

Secondo il presente insegnamento, il termine "antraciclina" si riferisce preferibilmente ad un agente, preferibilmente un agente anti-cancro per indurre apoptosi, preferibilmente mediante inibizione della rilegatura del DNA nella topoisomerasi II.

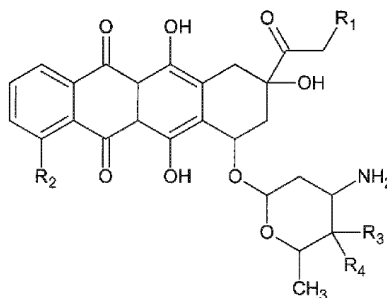
Preferibilmente, secondo l'insegnamento, il termine "antraciclina" si riferisce in generale ad una classe di composti aventi la seguente struttura ad anello



tra cui analoghi e derivati, sali farmaceutici, idrati, esteri, coniugati e loro pro-farmaci.

Esempi di antraciclina e analoghi di antraciclina includono, ma non sono limitati a, daunorubicina (daunomicina), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, idarubicina, rodomicina, pirarubicina, valrubicina, N-trifluoroacetile doxorubicina-14-valerato, aclacinomicina, morfolinodoxorubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorubicina (cianomorfolino-DOX), 2-pirrolino-doxorubicina (2-PDOX), 5-iminodaunomicina, mitoxantrone e aclacinomicina A (aclarubicina). Mitoxantrone è un membro della classe di composti di antracendione, che sono analoghi dell'antraciclina che non dispongono della porzione di zucchero delle antraciclina, ma conservano la struttura planare ad anello aromatico policiclico che consente l'intercalazione nel DNA.

Come antraciclina secondo l'invenzione è particolarmente preferito un composto della seguente formula:



in cui

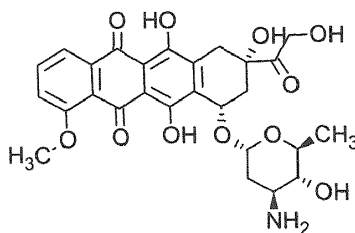
R<sub>1</sub> è scelto dal gruppo consistente di H e OH, R<sub>2</sub> è scelto dal gruppo consistente di H e OMe, R<sub>3</sub> è scelto dal gruppo consistente di H e OH, e R<sub>4</sub> è



scelto dal gruppo consistente di H e OH.

In una forma di realizzazione, R<sub>1</sub> è H, R<sub>2</sub> è OMe, R<sub>3</sub> è H, e R<sub>4</sub> è OH. In un'altra forma di realizzazione, R<sub>1</sub> è OH, R<sub>2</sub> è OMe, R<sub>3</sub> è H, e R<sub>4</sub> è OH. In un'altra forma di realizzazione, R<sub>1</sub> è OH, R<sub>2</sub> è OMe, R<sub>3</sub> è OH, e R<sub>4</sub> è H. In un'altra forma di realizzazione, R<sub>1</sub> è H, R<sub>2</sub> è H, R<sub>3</sub> è H, e R<sub>4</sub> è OH.

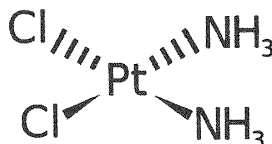
Come antraciclina nel contesto della presente invenzione è specificamente contemplata l'epirubicina. L'epirubicina è un farmaco antraciclinico che ha la formula seguente:



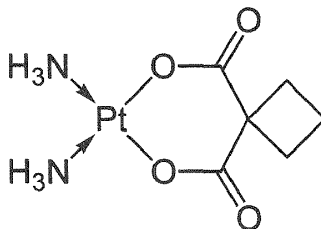
ed è commercializzata con il nome commerciale Ellence negli Stati Uniti e come Pharmorubicin o Epirubicin Ebewe altrove. In particolare, il termine "epirubicina" si riferisce al composto (8R,10S)-10-[(2S,4S,5R,6S)-4-amino-5-idrossi-6-metil-ossan-2-il]ossi-6,11-diidrossi-8-(2-idrossiacetil)-1-metossi-8-metil-9,10-diidro-7H-tetracen-5,12-dione. L'epirubicina è favorita rispetto alla doxorubicina, l'antraciclina più diffusa, in alcuni regimi di chemioterapia in quanto sembra causare minori effetti collaterali.

Secondo l'insegnamento, il termine "composto di platino" si riferisce a composti che contengono platino nella loro struttura, come i complessi di platino, e include composti quali cisplatino, carboplatino e oxaliplatino.

Il termine "cisplatino" si riferisce al composto *cis*-diaminodichloroplatino(II) (CDDP) della seguente formula:

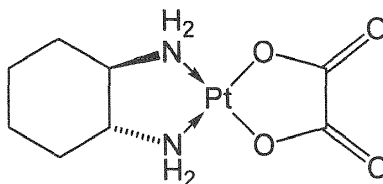


Il termine "carboplatino" si riferisce al composto *cis*-diamino(1,1-ciclobutandicarbossilato)platino(II) della seguente formula:



Il termine "oxaliplatino" si riferisce ad un composto che è un composto di platino che è complessato ad un ligando veicolante diaminocicloesano

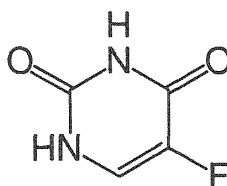
della seguente formula:



In particolare, il termine "oxaliplatino" si riferisce al composto [(1R,2R)-cicloesano-1,2-diamino](etandioato-O,O')platino(II). Oxaliplatino per iniezione è anche commercializzato con il nome commerciale Eloxatine.

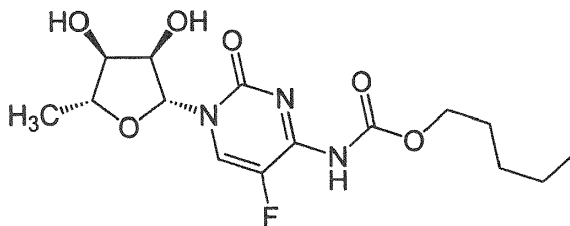
Il termine "analogo nucleosidico" si riferisce ad un analogo strutturale di un nucleoside, una categoria che comprende sia analoghi purinici che analoghi pirimidinici. In particolare, il termine "analogo nucleosidico" si riferisce a derivati di fluoropirimidina che comprendono fluorouracile e suoi pro-farmaci.

Il termine "fluorouracile" o "5-fluorouracile" (5-FU o f5U) (venduto con i marchi Adrucil, Carac, Efudix, Efudex e Fluoroplex) è un composto che è un analogo pirimidinico della seguente formula:



In particolare, il termine si riferisce al composto 5-fluoro-1H-pirimidin-2,4-dione.

Il termine "capecitabina" (Xeloda, Roche) si riferisce ad un agente chemioterapico che è un pro-farmaco che viene convertito in 5-FU nei tessuti. La capecitabina che può essere somministrata per via orale ha la seguente formula:

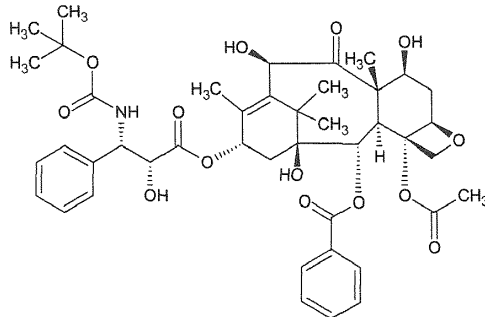


In particolare, il termine si riferisce al composto pentil-[1-(3,4-diidrossi-5-metiltetraidrofuran-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbammato.

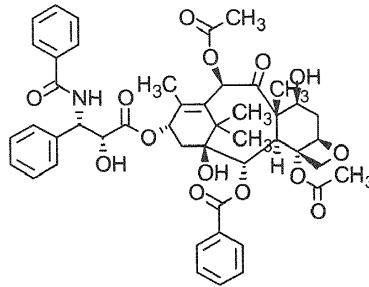
I tassani sono una classe di composti diterpenici che sono stati prima ottenuti da fonti naturali come le piante del genere Taxus, ma alcuni sono stati sintetizzati artificialmente. Il meccanismo principale di azione della classe di farmaci del tassano è l'alterazione della funzione dei microtubuli, con

conseguente inibizione del processo della divisione cellulare. I tassani includono docetaxel (Taxotere) e paclitaxel (Taxol).

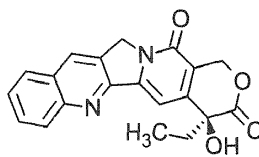
Secondo l'insegnamento, il termine "docetaxel" si riferisce ad un composto avente la seguente formula:



Secondo l'insegnamento, il termine "paclitaxel" si riferisce ad un composto avente la seguente formula:

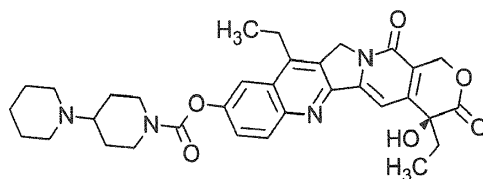


Secondo l'insegnamento, il termine "analogo di camptotecina" si riferisce a derivati del composto camptotecina (CPT; (S)-4-etil-4-idrossi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-3,14-(4H,12H)-dione). Preferibilmente, il termine "analogo di camptotecina" si riferisce a composti comprendenti la seguente struttura:



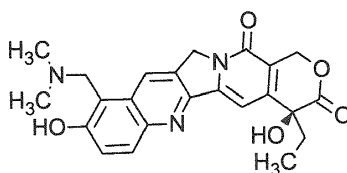
Secondo l'insegnamento, analoghi di camptotecina preferiti sono inibitori dell'enzima DNA topoisomerasi I (topo I). Analoghi di camptotecina preferiti secondo l'insegnamento sono irinotecano e topotecano.

Irinotecano è un farmaco che impedisce al DNA di svolgersi per inibizione della topoisomerasi I. In termini chimici, esso è un analogo semisintetico dell'alcaloide naturale camptotecina avente la seguente formula:



In particolare, il termine “irinotecano” si riferisce al composto (S)-4,11-diethyl-3,4,12,14-tetraidro-4-idrossi-3,14-dioxo1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]chinolin-9-il-[1,4'bipiperidin]-1'-carbossilato.

Topotecano è un inibitore della topoisomerasi di formula:



In particolare, il termine “topotecano” si riferisce al composto (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-diidrossi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]chinolin-3,14(4H,12H)-dione monocloridrato.

Secondo il presente insegnamento, un agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2 può essere un agente chemioterapico, in particolare un agente chemioterapico stabilito nel trattamento del cancro e può essere parte di una combinazione di farmaci, quale una combinazione di farmaci stabiliti per essere utilizzati nel trattamento del cancro. Tale combinazione di farmaci può essere una combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia e può essere una combinazione di farmaci utilizzata in un regime chemioterapico scelto dal gruppo consistente di chemioterapia **EOX**, chemioterapia **ECF**, chemioterapia **ECX**, chemioterapia **EOF**, chemioterapia **FLO**, chemioterapia **FOLFOX**, chemioterapia **FOLFIRI**, chemioterapia **DCF** e chemioterapia **FLOT**.

La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **EOX** comprende epirubicina, oxaliplatino e capecitabina. La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **ECF** comprende epirubicina, cisplatino e 5-fluorouracile. La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **ECX** comprende epirubicina, cisplatino e capecitabina. La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **EOF** comprende epirubicina, oxaliplatino e 5-fluorouracile.

L'epirubicina è normalmente somministrata ad una dose di 50 mg/m<sup>2</sup>, il cisplatino a 60 mg/m<sup>2</sup>, l'oxaliplatino a 130 mg/m<sup>2</sup>, l'infusione venosa protratta di 5-fluorouracile a 200 mg/m<sup>2</sup>/die e la capecitabina orale a 625 mg/m<sup>2</sup> due volte al giorno, per un totale di otto cicli di 3 settimane.

La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **FLO** comprende 5-fluorouracile, acido folinico e oxaliplatino (normalmente 5-fluorouracile 2.600 mg/m<sup>2</sup> infusione di 24 ore, acido folinico 200 mg/m<sup>2</sup> e oxaliplatino 85 mg/m<sup>2</sup>, ogni 2 settimane).

**FOLFOX** è un regime di chemioterapia composto da acido folinico (leucovorina), 5-fluorouracile e oxaliplatino. Il programma di dosaggio raccomandato somministrato ogni due settimane è il seguente: Giorno 1: infusione IV di 85 mg/m<sup>2</sup> Oxaliplatino e infusione IV di 200 mg/m<sup>2</sup> Leucovorina, seguita da bolo IV di 400 mg/m<sup>2</sup> 5-FU, seguito da infusione IV di 600 mg/m<sup>2</sup> 5-FU sotto forma di infusione continua di 22 ore; Giorno 2: infusione IV di 200 mg/m<sup>2</sup> Leucovorina per 120 minuti, seguita da bolo IV di 400 mg/m<sup>2</sup> 5-FU somministrato per 2-4 minuti, seguito da infusione IV di 600 mg/m<sup>2</sup> 5-FU sotto forma di infusione continua di 22 ore.

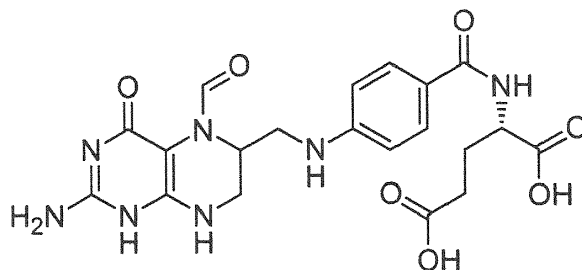
La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **FOLFIRI** comprende 5-fluorouracile, leucovorina e irinotecano.

La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **DCF** comprende docetaxel, cisplatino e 5-fluorouracile.

La combinazione di farmaci utilizzata nella chemioterapia **FLOT** comprende docetaxel, oxaliplatino, 5-fluorouracile e acido folinico.

Il termine “acido folinico” o “leucovorina” si riferisce ad un composto utile in combinazione sinergica con l’agente chemioterapico 5-fluorouracile.

L’acido folinico ha la seguente formula:



In particolare, il termine si riferisce al composto acido (2S)-2-[[4-[(2-amino-5-formil-4-oxo-5,6,7,8-tetraidro-1H-pteridin-6-il)metilamino]benzoi]amino}pentandioico.

Le cellule T  $\gamma\delta$  (cellule T gamma delta) rappresentano un piccolo sottoinsieme di cellule T che possiedono un recettore delle cellule T (TCR) differente sulla loro superficie. La maggioranza delle cellule T ha un TCR composto da due catene glicoproteiche denominate catene  $\alpha$  e  $\beta$  di TCR. Al contrario, nelle cellule T  $\gamma\delta$ , il TCR è costituito da una catena  $\gamma$  e da una catena  $\delta$ . Questo gruppo di cellule T è di solito molto meno comune rispetto alle cellule T  $\alpha\beta$ . Le cellule T  $\gamma\delta$  umane svolgono un ruolo importante nelle risposte di sorveglianza allo stress, quali malattie infettive e autoimmunità. Si suggerisce che anche i cambiamenti indotti dalla trasformazione nei tumori causino risposte di sorveglianza allo stress mediate dalle cellule T  $\gamma\delta$  e aumentino l’immunità antitumorale. E’ importante notare che, dopo l’occupazione dell’antigene, le cellule T  $\gamma\delta$  attivate a livello dei siti lesionali forniscono citochine (p.es.  $INF\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) e/o chemochine che mediano il reclutamento di altre cellule effettrici e mostrano funzioni effettrici immediate, quali citotossicità (tramite recettori di morte e vie di granuli citolitici) e ADCC.

La maggior parte delle cellule T  $\gamma\delta$  nel sangue periferico esprime il recettore delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (TCR $\gamma\delta$ ). Le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sono esclusive degli esseri umani e dei primati e si presume che svolgano un ruolo precoce e fondamentale nel rilevare "il pericolo" derivante da patogeni invadenti, poiché si espandono in modo significativo in molte infezioni acute e possono superare tutti gli altri linfociti entro pochi giorni, p.es. nella tubercolosi, nella salmonellosi, nella ehrlichiosi, nella brucellosi, nella tularemia, nella listeriosi, nella toxoplasmosi e nella malaria.

Le cellule T  $\gamma\delta$  rispondono a piccoli antigeni fosforilati non peptidici (fosfoantigeni) quali i pirofosfati sintetizzati nei batteri e l'isopentenile pirofosfato (IPP) prodotto nelle cellule di mammifero attraverso la via del mevalonato. Mentre la produzione di IPP nelle cellule normali non è sufficiente per l'attivazione delle cellule T  $\gamma\delta$ , la de-regolazione della via del mevalonato nelle cellule tumorali porta all'accumulo di IPP e all'attivazione delle cellule T  $\gamma\delta$ . Gli IPP possono anche essere aumentati terapeuticamente da aminobisfosfonati, che inibiscono l'enzima farnesil-pirofosfato sintasi (FPPS) della via del mevalonato. Tra gli altri, l'acido zoledronico (ZA, zoledronato, Zometa™, Novartis) rappresenta un tale aminobisfosfonato, già clinicamente somministrato ai pazienti per il trattamento dell'osteoporosi e della malattia ossea metastatica. In seguito a trattamento di PBMC *in vitro*, ZA viene assorbito in particolare dai monociti. L'IPP si accumula nei monociti ed essi si differenziano in cellule antigene-presentanti stimolando lo sviluppo di cellule T  $\gamma\delta$ . In questa situazione, l'aggiunta di interleuchina-2 (IL-2) è preferita come fattore di crescita e sopravvivenza per le cellule T  $\gamma\delta$  attivate. Infine, è stato descritto che alcune ammine alchilate attivano le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 *in vitro*, tuttavia solo a concentrazioni millimolari.

Secondo il presente insegnamento, il termine "agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ " si riferisce a composti che stimolano lo sviluppo di cellule T  $\gamma\delta$ , in particolare cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, *in vitro* e/o *in vivo*, in particolare inducendo l'attivazione e l'espansione delle cellule T  $\gamma\delta$ . Preferibilmente, il termine si riferisce a composti che aumentano *in vitro* e/o *in vivo* isopentenile pirofosfato (IPP) prodotto nelle cellule di mammifero, preferibilmente inibendo l'enzima farnesil-pirofosfato sintasi (FPPS) della via del mevalonato.

Un particolare gruppo di composti che stimolano le cellule T  $\gamma\delta$  sono i bisfosfonati, in particolare bisfosfonati contenenti azoto (N-bisfosfonati; aminobisfosfonati).

Ad esempio, bisfosfonati idonei per l'impiego nell'invenzione possono includere uno o più dei seguenti composti, inclusi analoghi e derivati, sali farmaceutici, idrati, esteri, coniugati e loro pro-farmaci:

[1-idrossi-2-(1H-imidazol-1-il)etan-1,1-diil]bis(acido fosfonico), acido zoledronico, p.es. zoledronato;

acido (dicloro-fosfono-metil)fosfonico, p.es. clodronato

{1-idrossi-3-[metil(pentil)amino]propan-1,1-diil}bis(acido fosfonico), acido ibandronico, p.es. ibandronato

(3-amino-1-idrossipropan-1,1-diil)bis(acido fosfonico), acido pamidronico, p.es. pamidronato;

acido (1-idrossi-1-fosfono-2-piridin-3-il-etil)fosfonico, acido risedronico, p.es. risedronato;

acido (1-idrossi-2-imidazo[1,2-a]piridin-3-il-1-fosfonoetil)fosfonico, acido minodronico;

[3-(dimetilamino)-1-idrossipropan-1,1-diil]bis(acido fosfonico), acido olpadronico;

acido [4-amino-1-idrossi-1-(idrossi-ossido-fosforil)-butil]fosfonico, acid alendronico, p.es. alendronato;

[(cicloetilamino)metilen]bis(acido fosfonico), acido incadronico;

(1-idrossietan-1,1-diil)bis(acido fosfonico), acido etidronico, p.es. etidronato; e

{[(4-clorofenil)tio]metilen}bis(acido fosfonico), acido tiludronico.

Secondo l'insegnamento, l'acido zoledronico (INN) o zoledronato (commercializzato da Novartis con i nomi commerciali Zometa, Zomera, Aclasta e Reclast) è un bisfosfonato particolarmente preferito. Zometa è utilizzato per prevenire fratture scheletriche in pazienti affetti da cancro, quali mieloma multiplo e cancro alla prostata, nonché per il trattamento dell'osteoporosi. Esso può anche essere utilizzato per trattare l'ipercalcemia della malignità e può essere utile per il trattamento del dolore da metastasi ossee.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, un agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  secondo l'invenzione viene somministrato in combinazione con IL-2. Tale combinazione si è dimostrata particolarmente efficace nel mediare l'espansione e l'attivazione delle cellule T  $\gamma\delta$ .

L'interleuchina-2 (IL-2) è un'interleuchina, un tipo di molecola di segnalazione citochinica nel sistema immunitario. Essa è una proteina che attrae i linfociti e fa parte della risposta naturale del corpo all'infezione microbica e discrimina tra esogeno (non sé) e sé. IL-2 media i suoi effetti legandosi a recettori di IL-2, che sono espressi da linfociti.

L'IL-2 utilizzata secondo l'invenzione può essere qualsiasi IL-2 che supporta o consente la stimolazione delle cellule T  $\gamma\delta$  e può essere derivata da qualsiasi specie, preferibilmente quella umana. IL-2 può essere isolata, prodotta in modo ricombinante o IL-2 sintetica e può essere IL-2 naturale o modificata.

In una forma di attuazione del presente insegnamento, la chemioterapia standard secondo il regime EOX in combinazione con un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2, in particolare IMAB362, viene somministrata per un massimo di 8 cicli. Le dosi e i tempi possono essere i seguenti:

- 50 mg/m<sup>2</sup> di epirubicina verranno somministrati i.v. come infusione di 15 minuti il giorno 1 di ciascun ciclo durante la fase EOX.
- 130 mg/m<sup>2</sup> di oxaliplatino verranno somministrati i.v. come infusione di 2 h il giorno 1 di ciascun ciclo durante la fase EOX.
- 625 mg/m<sup>2</sup> di capecitabina vengono assunti p.o. due volte al giorno per 21 giorni al mattino e alla sera a partire dalla sera del giorno 1 di

ciascun ciclo durante la fase EOX.

- 1000 mg/m<sup>2</sup> di anticorpo verranno somministrati i.v. come infusione di 2 h il giorno 1 del ciclo 1. Poi, 600 mg/m<sup>2</sup> di anticorpo verranno somministrati i.v. come infusione di 2 h il giorno 1 di ogni altro ciclo al completamento dell'infusione di oxaliplatino.
- Al termine della chemioterapia, il paziente continuerà con l'assunzione di 600 mg/m<sup>2</sup> di anticorpo come infusione di 2 h ogni 3 o 4 settimane.

In una forma di realizzazione del presente insegnamento, la chemioterapia standard secondo il regime EOX in combinazione con ZA/IL-2 e un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2, in particolare IMAB362, viene somministrata per un massimo di 8 cicli (24 settimane).

Il termine "antigene" si riferisce ad un agente, quale una proteina o un peptide, che comprende un epitopo contro il quale è diretta e/o dovrà essere diretta una risposta immunitaria. In una particolare forma di realizzazione, un antigene è un antigene tumore-associato, quale CLDN18.2, cioè un costituente di cellule cancerose che può derivare dal citoplasma, dalla superficie cellulare e dal nucleo della cellula, in particolare quegli antigeni che vengono prodotti, preferibilmente in grande quantità, all'interno della cellula o come antigeni di superficie su cellule cancerose.

Nel contesto del presente insegnamento, il termine "antigene tumore-associato" si riferisce preferibilmente a proteine che sono in condizioni normali specificamente espresse in un numero limitato di tessuti e/o organi o in fasi di sviluppo specifiche e sono espresse o espresse in maniera aberrante in uno o più tessuti tumorali o cancerosi. Nel contesto del presente insegnamento, l'antigene tumore-associato è preferibilmente associato alla superficie cellulare di una cellula cancerosa e preferibilmente non è espresso o è espresso solo raramente nei tessuti normali.

Il termine "epitopo" si riferisce ad un determinante antigenico in una molecola, cioè alla parte di una molecola che è riconosciuta dal sistema immunitario, ad esempio riconosciuta da un anticorpo. Ad esempio, gli epitopi sono i siti discreti tridimensionali di un antigene che sono riconosciuti dal sistema immunitario. Gli epitopi di solito consistono di raggruppamenti in superficie chimicamente attivi di molecole, quali aminoacidi o catene laterali di zucchero, e di solito hanno caratteristiche strutturali tridimensionali specifiche, nonché caratteristiche di carica specifiche. Gli epitopi conformazionali e non conformazionali si distinguono per il fatto che il legame con il primo, ma non con il secondo, viene perso in presenza di solventi denaturanti. Un epitopo di una proteina, quale CLDN18.2, comprende preferibilmente una porzione continua o discontinua di detta proteina e preferibilmente ha una lunghezza tra 5 e 100, preferibilmente tra 5 e 50, più preferibilmente tra 8 e 30, di massima preferenza tra 10 e 25 aminoacidi, per esempio l'epitopo può preferibilmente avere una lunghezza di 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoacidi.

Il termine "anticorpo" si riferisce ad una glicoproteina comprendente almeno due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) legate tra loro da legami disolfuro e include qualsiasi molecola comprendente una sua porzione di legame all'antigene. Il termine "anticorpo" include anticorpi monoclonali e



frammenti o derivati di anticorpi, inclusi, senza limitazione, anticorpi umani, anticorpi umanizzati, anticorpi chimerici, anticorpi a catena singola, p.es. scFv e frammenti anticorpali leganti l'antigene, quali frammenti Fab e Fab', e include anche tutte le forme ricombinanti di anticorpi, p.es. anticorpi espressi in procarioti, anticorpi non glicosilati e qualsiasi frammento e derivato anticorpale legante l'antigene qui descritto. Ciascuna catena pesante è costituita da una regione variabile a catena pesante (qui abbreviata VH) e da una regione costante a catena pesante. Ciascuna catena leggera è costituita da una regione variabile a catena leggera (qui abbreviata VL) e da una regione costante a catena leggera. Le regioni VH e VL possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, denominate regioni determinanti la complementarità (CDR), intervallate a regioni più conservate, denominate regioni cornice (FR). Ciascuna VH e VL è composta da tre CDR e quattro FR, disposte dal terminale amminico al terminale carbossilico nel seguente ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le regioni variabili delle catene pesanti e leggere contengono un dominio di legame che interagisce con un antigene. Le regioni costanti degli anticorpi possono mediare il legame dell'immunoglobulina a tessuti o fattori dell'ospite, tra cui varie cellule del sistema immunitario (p.es. cellule effettrici) ed il primo componente (C1q) del sistema del complemento classico.

Gli anticorpi qui descritti possono essere anticorpi umani. Con il termine "anticorpo umano", come qui utilizzato, si intende includere anticorpi aventi regioni variabili e costanti derivate da sequenze di immunoglobuline della linea germinale umana. Gli anticorpi umani qui descritti possono includere residui di aminoacidi non codificati da sequenze di immunoglobuline della linea germinale umana (ad esempio, mutazioni introdotte da mutagenesi casuale o sito-specifica *in vitro* o da mutazione somatica *in vivo*).

Il termine "anticorpo umanizzato" si riferisce ad una molecola avente un sito di legame all'antigene che è sostanzialmente derivato da una immunoglobulina di una specie non umana, in cui la restante struttura immunoglobulinica della molecola è basata sulla struttura e/o sequenza di una immunoglobulina umana. Il sito di legame all'antigene può comprendere domini variabili completi fusi a domini costanti o solo le regioni determinanti la complementarità (CDR) innestate su regioni a cornice appropriate nei domini variabili. I siti di legame all'antigene possono essere di tipo selvatico o modificati da una o più sostituzioni di aminoacidi, p.es. modificati per assomigliare più strettamente alle immunoglobuline umane. Alcune forme di anticorpi umanizzati conservano tutte le sequenze CDR (ad esempio un anticorpo di topo umanizzato che contiene tutte e sei le CDR dell'anticorpo del topo). Altre forme hanno una o più CDR che sono alterate rispetto all'anticorpo originale.

Il termine "anticorpo chimerico" si riferisce a quegli anticorpi in cui una porzione di ciascuna delle sequenze amminoacidiche delle catene pesanti e leggere è omologa a sequenze corrispondenti in anticorpi derivanti da una particolare specie o appartenenti ad una particolare classe, mentre il restante segmento della catena è omologo a sequenze corrispondenti in un'altra. Tipicamente, la regione variabile di entrambe le catene leggera e pesante

mima le regioni variabili di anticorpi derivanti da una specie di mammifero, mentre le porzioni costanti sono omologhe a sequenze di anticorpi derivanti da un'altra. Un vantaggio evidente di tali forme chimeriche è che la regione variabile può convenientemente essere ottenuta da fonti attualmente conosciute utilizzando cellule B o ibridomi prontamente disponibili di organismi ospiti non umani in combinazione con regioni costanti derivate da, ad esempio, preparazioni cellulari umane. Mentre la regione variabile ha il vantaggio della facilità di preparazione e la specificità non è influenzata dalla fonte, la regione costante, essendo umana, è meno probabile che generi una risposta immunitaria da un soggetto umano quando gli anticorpi vengono iniettati di quanto non lo farebbe la regione costante di una fonte non umana. Comunque, la definizione non è limitata a questo esempio particolare.

I termini "porzione antigene-legante" di un anticorpo (o semplicemente "porzione di legame") o "frammento antigene-legante" di un anticorpo (o semplicemente "frammento di legame") o termini simili si riferiscono a uno o più frammenti di un anticorpo che conservano la capacità di legarsi specificamente ad un antigene. È stato dimostrato che la funzione antigene-legante di un anticorpo può essere eseguita da frammenti di un anticorpo intero. Esempi di frammenti di legame compresi nel termine "porzione antigene-legante" di un anticorpo includono (i) frammenti Fab, frammenti monovalenti consistenti di domini VL, VH, CL e CH; (ii) frammenti F(ab)<sub>2</sub>, frammenti bivalenti comprendenti due frammenti Fab associati da un ponte disolfuro alla regione a cerniera; (iii) frammenti Fd consistenti dei domini VH e CH; (iv) frammenti Fv consistenti dei domini VL e VH di un singolo braccio di un anticorpo; (v) frammenti dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), che consistono di un dominio VH; (vi) regioni determinanti la complementarità (CDR) isolate, e (vii) combinazioni di due o più CDR isolate che possono essere eventualmente unite da un linker sintetico. Inoltre, sebbene i due domini del frammento Fv, VL e VH, siano codificati da geni separati, essi possono essere uniti, utilizzando metodi ricombinanti, da un linker sintetico che consente loro di costituire una singola catena proteica in cui le regioni VL e VH si appaiano a formare molecole monovalenti (note come Fv a singola catena (scFv), si vedano, p.es., Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). E' inteso che anche tali anticorpi a catena singola sono compresi nel termine "frammento antigene-legante" di un anticorpo. Un ulteriore esempio è costituito da proteine di fusione immunoglobuliniche di domini di legame che comprendono (i) un polipeptide di un dominio di legame che è fuso ad un polipeptide di una regione immunoglobulinica a cerniera, (ii) una regione costante CH2 di catena pesante immunoglobulinica fusa alla regione a cerniera e (iii) una regione costante CH3 di catena pesante immunoglobulinica fusa alla regione costante CH2. Il polipeptide del dominio di legame può essere una regione variabile a catena pesante o una regione variabile a catena leggera. Le proteine di fusione immunoglobuliniche di domini di legame sono ulteriormente descritte in US 2003/0118592 e US 2003/0133939. Questi frammenti anticorpali vengono ottenuti utilizzando tecniche convenzionali note agli esperti del settore e i frammenti vengono sottoposti a screening per l'utilità nello stesso

modo degli anticorpi intatti.

Con il termine "molecola bispecifica" si intende includere qualsiasi agente, ad esempio una proteina, un peptide o un complesso proteico o peptidico, che abbia due diverse specificità di legame. Ad esempio, la molecola può legarsi a o interagire con (a) un antigene di superficie cellulare e (b) un recettore di Fc sulla superficie di una cellula effettrice. Con il termine "molecola multispecifica" o "molecola eterospecifica" si intende includere qualsiasi agente, ad esempio una proteina, un peptide o un complesso proteico o peptidico, che abbia più di due differenti specificità di legame. Ad esempio, la molecola può legarsi a o interagire con (a) un antigene di superficie cellulare, (b) un recettore di Fc sulla superficie di una cellula effettrice, e (c) almeno un altro componente. Di conseguenza, l'invenzione comprende, ma non è limitata a, molecole bispecifiche, trispecifiche, tetraspecifiche e altre molecole multispecifiche che sono dirette a CLDN18.2 e ad altri bersagli, come i recettori di Fc sulle cellule effettrici. Il termine "anticorpi bispecifici" comprende anche "diabodies". I "diabodies" sono anticorpi bispecifici bivalenti, in cui i domini VH e VL sono espressi su una singola catena polipeptidica, ma attraverso un linker che è troppo corto per consentire l'appaiamento tra i due domini della stessa catena, forzando così i domini ad appaiarsi con domini complementari di un'altra catena e creando due siti di legame all'antigene (si vedano, p.es., Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

Un anticorpo può essere coniugato ad una porzione o ad un agente terapeutica/o, ad esempio una citotossina, un farmaco (p.es. un immunosoppressore) o un radioisotopo. Una citotossina o un agente citotossico comprende qualsiasi agente che sia dannoso e, in particolare, che uccida le cellule. Esempi includono taxolo, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossi-antracin-dione, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo e puromicina e loro analoghi o omologhi. Agenti terapeutici adatti per formare coniugati con anticorpi includono, ma non sono limitati a, antimetaboliti (p.es., metotrexato, 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracile decarbazina), agenti alchilanti (p.es., mecloretamina, tioepa clorambucile, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfan, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracicline (p.es., daunorubicina (già daunomicina) e doxorubicina), antibiotici (p.es., dactinomicina (già actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC), e agenti antimetaboliti (p.es., vincristina e vinblastina). In una forma di realizzazione preferita, l'agente terapeutico è un agente citotossico o un agente radiotossico. In un'altra forma di realizzazione, l'agente terapeutico è un immunosoppressore. In un'altra forma di realizzazione ancora, l'agente terapeutico è GM-CSF. In una forma di realizzazione preferita, l'agente terapeutico è doxorubicina, cisplatino, bleomicina, solfato, carmustina, clorambucile, ciclofosfamide o ricina A.

Gli anticorpi possono anche essere coniugati con un radioisotopo, ad esempio, iodio-131, ittrio-90 o indio-111, per generare radio-farmaci citotossici.

I coniugati anticorpali dell'insegnamento possono essere utilizzati per modificare una data risposta biologica e la parte farmaceutica non deve essere considerata come limitata ad agenti terapeutici chimici classici. Ad esempio, la parte farmaceutica può essere una proteina o un polipeptide che possiede un'attività biologica desiderata. Tali proteine possono includere, ad esempio, una tossina enzimaticamente attiva, o un suo frammento attivo, come abrina, ricina A, esotossina di *Pseudomonas* o tossina difterica; una proteina come il fattore di necrosi tumorale o l'interferone- $\gamma$ ; o modificatori della risposta biologica, quali ad esempio linfocine, interleuchina-1 ("IL-1"), interleuchina-2 ("IL-2"), interleuchina-6 ("IL-6"), il fattore stimolante colonie di granulociti e macrofagi ("GM-CSF"), il fattore stimolante colonie di granulociti ("G-CSF") o altri fattori di crescita.

Tecniche per coniugare tale porzione terapeutica ad anticorpi sono ben note, si vedano, p.es., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery (2<sup>a</sup> Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Come qui utilizzato, un anticorpo è "derivato da" una particolare sequenza della linea germinale se l'anticorpo viene ottenuto da un sistema mediante immunizzazione di un animale o screening di una libreria di geni immunoglobulinici, e in cui l'anticorpo selezionato è almeno al 90%, più preferibilmente almeno al 95%, ancora più preferibilmente almeno al 96%, 97%, 98%, o 99% identico per sequenza amminoacidica alla sequenza amminoacidica codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale. In genere, un anticorpo derivato da una particolare sequenza della linea germinale non mostrerà più di 10 differenze amminoacidiche, più preferibilmente non più di 5, o ancora più preferibilmente, non più di 4, 3, 2 o 1 differenze amminoacidiche rispetto alla sequenza amminoacidica codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale.

Come qui utilizzato, il termine "eteroanticorpi" si riferisce a due o più anticorpi, loro derivati o regioni leganti l'antigene, legati tra loro, di cui almeno due hanno specificità diverse. Queste diverse specificità includono una specificità di legame per un recettore di Fc su una cellula effettrice e una specificità di legame per un antigene o un epitopo su una cellula bersaglio, ad esempio una cellula tumorale.

Gli anticorpi qui descritti possono essere anticorpi monoclonali. Il termine "anticorpo monoclonale", come qui utilizzato, si riferisce ad una preparazione di molecole anticorpali a singola composizione molecolare. Un anticorpo monoclonale mostra una singola specificità e affinità di

legame. In una forma di realizzazione, gli anticorpi monoclonali sono prodotti da un ibridoma che comprende una cellula B ottenuta da un animale non umano, ad esempio un topo, fusa ad una cellula immortalizzata.

Gli anticorpi qui descritti possono essere anticorpi ricombinanti. Il termine "anticorpo ricombinante", come qui utilizzato, comprende tutti gli anticorpi che vengono preparati, espressi, creati o isolati mediante mezzi ricombinanti, quali (a) anticorpi isolati da un animale (p.es. un topo) transgenico o transcromosomico rispetto ai geni dell'immunoglobulina o un ibridoma preparato da essi; (b) anticorpi isolati da una cellula ospite trasformata per esprimere l'anticorpo, ad esempio da un trasfettoma, (c) anticorpi isolati da una libreria combinatoria di anticorpi ricombinanti e (d) anticorpi preparati, espressi, creati o isolati con qualsiasi altro mezzo che implichi lo splicing di sequenze di geni immunoglobulinici con altre sequenze di DNA.

Gli anticorpi qui descritti possono derivare da diverse specie, tra cui, ma non limitate a, topo, ratto, coniglio, cavia ed essere umano.

Gli anticorpi qui descritti includono anticorpi policlonali e monoclonali e includono anticorpi IgA, come IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. In varie forme di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo IgG1, in particolare un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda (cioè IgG1,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticorpo IgG2a (p.es. IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticorpo IgG2b (p.es. IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), un anticorpo IgG3 (p.es. IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) o un anticorpo IgG4 (p.es. IgG4,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ).

Il termine "trasfettoma", come qui utilizzato, comprende cellule ospiti eucariotiche ricombinanti che esprimono un anticorpo, quali cellule CHO, cellule NS/0, cellule HEK293, cellule HEK293T, cellule vegetali o fungine, tra cui cellule di lievito.

Come qui utilizzato, un "anticorpo eterologo" è definito in relazione ad un organismo transgenico che produce un tale anticorpo. Questo termine si riferisce ad un anticorpo avente una sequenza amminoacidica o una sequenza di acido nucleico codificante corrispondente a quella che si trova in un organismo non consistente dell'organismo transgenico e che è generalmente derivato da una specie diversa dall'organismo transgenico.

Come qui utilizzato, un "anticorpo eteroibrido" si riferisce ad un anticorpo avente catene leggere e pesanti di organismi di origini diverse. Ad esempio, un anticorpo avente una catena pesante umana associata ad una catena leggera murina è un anticorpo eteroibrido.

L'insegnamento comprende tutti gli anticorpi e i derivati degli anticorpi qui descritti che, ai fini dell'insegnamento, sono inclusi nel termine "anticorpo". Il termine "derivati anticorpali" si riferisce a qualsiasi forma modificata di un anticorpo, ad esempio un coniugato dell'anticorpo con un altro agente o anticorpo, o un frammento dell'anticorpo.

Gli anticorpi qui descritti sono preferibilmente isolati. Con "anticorpo isolato", come qui utilizzato, si intende far riferimento ad un anticorpo che è sostanzialmente privo di altri anticorpi aventi differenti specificità antigeniche (ad esempio un anticorpo isolato che si lega specificamente a CLDN18.2 è sostanzialmente privo di anticorpi che legano specificamente antigeni diversi da CLDN18.2). Un anticorpo isolato che si lega

specificamente ad un epitopo, una isoforma o una variante di CLDN18.2 umano può comunque mostrare reattività crociata con altri antigeni correlati, ad esempio di altre specie (p.es. omologhi di specie di CLDN18.2). Inoltre, un anticorpo isolato può essere sostanzialmente privo di altro materiale cellulare e/o di sostanze chimiche. In una forma di realizzazione, una combinazione di anticorpi monoclonali "isolati" si riferisce ad anticorpi aventi specificità diverse e combinati in una composizione o miscela ben definita.

Il termine "legame" secondo l'insegnamento si riferisce preferibilmente ad un legame specifico.

Secondo il presente insegnamento, un anticorpo è in grado di legarsi ad un bersaglio predeterminato se ha un'affinità significativa per detto bersaglio predeterminato e si lega a detto bersaglio predeterminato in saggi standard. La "affinità" o "affinità di legame" viene spesso misurata mediante la costante di dissociazione all'equilibrio ( $K_D$ ). Preferibilmente, il termine "affinità significativa" si riferisce al legame ad un bersaglio predeterminato con una costante di dissociazione ( $K_D$ ) di  $10^{-5}$  M o inferiore,  $10^{-6}$  M o inferiore,  $10^{-7}$  M o inferiore,  $10^{-8}$  M o inferiore,  $10^{-9}$  M o inferiore,  $10^{-10}$  M o inferiore,  $10^{-11}$  M o inferiore, o  $10^{-12}$  M o inferiore.

Un anticorpo non è (sostanzialmente) capace di legarsi ad un bersaglio se non ha un'affinità significativa per detto bersaglio e non si lega significativamente, in particolare non si lega in maniera rivelabile, a detto bersaglio in saggi standard. Preferibilmente, l'anticorpo non si lega in maniera rivelabile a detto bersaglio se presente a una concentrazione di fino a 2, preferibilmente 10, più preferibilmente 20, in particolare 50 o 100  $\mu\text{g/ml}$  o superiore. Preferibilmente, un anticorpo non ha affinità significativa per un bersaglio se si lega a detto bersaglio con una  $K_D$  che è almeno 10 volte, 100 volte,  $10^3$  volte,  $10^4$  volte,  $10^5$  volte o  $10^6$  volte superiore alla  $K_D$  per il legame al bersaglio predeterminato che l'anticorpo è in grado di legare. Ad esempio, se la  $K_D$  per il legame di un anticorpo al bersaglio che l'anticorpo è in grado di legare è di  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  per il legame ad un bersaglio per il quale l'anticorpo non ha un'affinità significativa sarebbe di almeno  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M, o  $10^{-1}$  M.

Un anticorpo è specifico per un bersaglio predeterminato se è in grado di legarsi a detto bersaglio predeterminato, mentre non è in grado di legarsi ad altri bersagli, cioè non ha affinità significativa per altri bersagli e non si lega in modo significativo ad altri bersagli in saggi standard. Secondo l'invenzione, un anticorpo è specifico per CLDN18.2 se è in grado di legarsi a CLDN18.2 ma non è (sostanzialmente) in grado di legarsi ad altri bersagli. Preferibilmente, un anticorpo è specifico per CLDN18.2 se l'affinità per e il legame a tali altri bersagli non supera significativamente l'affinità per o il legame a proteine non correlate a CLDN18.2, quali sieralbumina bovina (BSA), caseina, sieralbumina umana (HSA) o proteine transmembrana non claudiniche quali molecole MHC o il recettore della transferrina o qualsiasi altro polipeptide specificato. Preferibilmente, un anticorpo è specifico per un bersaglio predeterminato se si lega a detto bersaglio con una  $K_D$  che è almeno 10 volte, 100 volte,  $10^3$  volte,  $10^4$  volte,  $10^5$  volte o  $10^6$  volte inferiore alla  $K_D$  per il legame a un bersaglio per il quale non è specifico. Ad esempio, se la  $K_D$  per il legame di un anticorpo al

bersaglio per il quale è specifico è di  $10^{-7}$  M, la  $K_D$  per il legame ad un bersaglio per il quale non è specifico sarebbe di almeno  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M,  $10^{-2}$  M, o  $10^{-1}$  M.

Il legame di un anticorpo ad un bersaglio può essere determinato sperimentalmente utilizzando qualsiasi metodo adatto; si vedano, per esempio, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), e metodi qui descritti. Le affinità possono essere prontamente determinate utilizzando tecniche convenzionali, come la dialisi all'equilibrio; utilizzando lo strumento BIAcore 2000, con procedure generali descritte dal produttore; mediante saggi radioimmunologici utilizzando un antigene bersaglio radio-marcato; o per mezzo di un altro metodo noto agli esperti. I dati di affinità possono essere analizzati, ad esempio, tramite il metodo di Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949). L'affinità misurata di una particolare interazione anticorpo-antigene può variare se misurata in condizioni diverse, ad esempio concentrazione di sale, pH. Pertanto, le misurazioni dell'affinità e di altri parametri di legame all'antigene, p.es.  $K_D$ ,  $IC_{50}$ , vengono preferibilmente condotte con soluzioni standardizzate di anticorpo e antigene e con un tampone standardizzato.

Come qui utilizzato, "isotipo" si riferisce alla classe anticorpale (p.es. IgM o IgG1) codificata da geni della regione costante a catena pesante.

Come qui utilizzata, "commutazione di isotipo" si riferisce al fenomeno per cui la classe, o l'isotipo, di un anticorpo cambia da una classe di Ig ad una delle altre classi di Ig.

Il termine "presente in natura", come qui utilizzato applicato ad un oggetto, si riferisce al fatto che un oggetto può essere trovato in natura. Ad esempio, una sequenza polipeptidica o polinucleotidica presente in un organismo (compresi i virus) che può essere isolata da una fonte naturale e che non è stata modificata intenzionalmente dall'uomo in laboratorio è presente in natura.

Il termine "riarrangiato/a", come qui utilizzato, si riferisce ad una configurazione di un locus di immunoglobulina a catena pesante o leggera in cui un segmento V è posizionato immediatamente adiacente ad un segmento D-J o J in una conformazione codificante essenzialmente un dominio completo rispettivamente VH o VL. Un locus genico riarrangiato di una immunoglobulina (anticorpo) può essere identificato per confronto con il DNA della linea germinale; un locus riarrangiato avrà almeno un elemento di omologia eptamero/nonamero ricombinato.

Il termine "non riarrangiato/a" o "configurazione della linea germinale", come qui utilizzato con riferimento ad un segmento V, si riferisce alla configurazione in cui il segmento V non è ricombinato, in modo da essere immediatamente adiacente ad un segmento D o J.

Secondo l'insegnamento, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo capace di legarsi ad un epitopo presente in CLDN18.2, preferibilmente un epitopo situato entro i domini extracellulari di CLDN18.2, in particolare nel primo dominio extracellulare, preferibilmente tra le

posizioni amminoacidiche 29 a 78 di CLDN18.2. In forme di realizzazione particolari, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo capace di legarsi a (i) un epitopo su CLDN18.2 che non è presente su CLDN18.1, preferibilmente SEQ ID NO: 3, 4 e 5, (ii) un epitopo situato su CLDN18.2-loop1, preferibilmente SEQ ID NO: 8, (iii) un epitopo situato su CLDN18.2-loop2, preferibilmente SEQ ID NO: 10, (iv) un epitopo situato su CLDN18.2-loopD3, preferibilmente SEQ ID NO: 11, (v) un epitopo che comprende CLDN18.2-loop1 e CLDN18.2-loopD3, oppure (vi) un epitopo non glicosilato situato su CLDN18.2-loopD3, preferibilmente SEQ ID NO: 9.

Secondo l'insegnamento, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è preferibilmente un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 ma non a CLDN18.1. Preferibilmente, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è specifico per CLDN18.2. Preferibilmente, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è preferibilmente un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 espresso sulla superficie cellulare. In particolari forme di realizzazione preferite, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 si lega a epitopi nativi di CLDN18.2 presenti sulla superficie di cellule vive. Preferibilmente, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 si lega a uno o più peptidi scelti dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 e 48-50. Preferibilmente, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è specifico per le proteine, i peptidi o i frammenti immunogenici o loro derivati sopra menzionati. Un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 può essere ottenuto con un metodo comprendente la fase di immunizzazione di un animale con una proteina o un peptide comprendente una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 1, 3-11, 44, 46 e 48-50, oppure con un acido nucleico o una cellula ospite che esprime detta/o proteina o peptide. Preferibilmente, l'anticorpo si lega a cellule cancerose, in particolare a cellule dei tipi di cancro menzionati sopra e, preferibilmente, non si lega sostanzialmente a cellule non cancerose.

Preferibilmente, il legame di un anticorpo avente la capacità di legarsi a cellule che esprimono CLDN18.2 induce o media l'uccisione di cellule che esprimono CLDN18.2. Le cellule che esprimono CLDN18.2 sono preferibilmente cellule cancerose e sono, in particolare, scelte dal gruppo consistente di cellule cancerogene gastriche, esofagee, pancreatiche, polmonari, ovariche, coloniche, epatiche, di testa-collo e della cistifellea. Preferibilmente, l'anticorpo induce o media l'uccisione delle cellule tramite induzione di una o più fra lisi mediata dalla citotossicità dipendente dal complemento (CDC), lisi mediata dalla citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), apoptosi e inibizione della proliferazione delle cellule che esprimono CLDN18.2. Preferibilmente, la lisi delle cellule mediata da ADCC avviene in presenza di cellule effettrici, che in particolari forme di realizzazione sono scelte dal gruppo consistente di monociti, cellule mononucleate, cellule NK e PMN. L'inibizione della proliferazione delle cellule può essere misurata in vitro determinando la proliferazione delle cellule in un saggio utilizzando bromodesossipurina (5-bromo-2-desossipurina, BrdU). BrdU è un nucleoside sintetico che è un analogo della timidina e può essere incorporato nel DNA appena sintetizzato delle cellule in



replicazione (durante la fase S del ciclo cellulare), sostituendo la timidina durante la replicazione del DNA. La rivelazione dell'agente chimico incorporato utilizzando, ad esempio, anticorpi specifici per BrdU indica le cellule che stanno replicando attivamente il proprio DNA.

In forme di realizzazione preferite, gli anticorpi qui descritti possono essere caratterizzati da una o più delle seguenti proprietà:

- a) specificità per CLDN18.2;
- b) affinità di legame per CLDN18.2 di circa 100 nM o meno, preferibilmente di circa 5-10 nM o meno e, più preferibilmente, di circa 1-3 nM o meno,
- c) capacità di indurre o mediare CDC su cellule CLDN18.2-positive;
- d) capacità di indurre o mediare ADCC su cellule CLDN18.2-positive;
- e) capacità di inibire la crescita di cellule CLDN18.2-positive;
- f) capacità di indurre apoptosi di cellule CLDN18.2-positive.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è prodotto da un ibridoma depositato presso la DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Germania, nuovo indirizzo: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Germania) e avente il seguente numero di designazione e di accesso:

- a. 182-D1106-055, accesso n. DSM ACC2737, depositato il 19 Ottobre 2005
- b. 182-D1106-056, accesso n. DSM ACC2738, depositato il 19 Ottobre 2005
- c. 182-D1106-057, accesso n. DSM ACC2739, depositato il 19 Ottobre 2005
- d. 182-D1106-058, accesso n. DSM ACC2740, depositato il 19 Ottobre 2005
- e. 182-D1106-059, accesso n. DSM ACC2741, depositato il 19 Ottobre 2005
- f. 182-D1106-062, accesso n. DSM ACC2742, depositato il 19 Ottobre 2005
- g. 182-D1106-067, accesso n. DSM ACC2743, depositato il 19 Ottobre 2005
- h. 182-D758-035, accesso n. DSM ACC2745, depositato il 17 Nov. 2005
- i. 182-D758-036, accesso n. DSM ACC2746, depositato il 17 Nov. 2005
- j. 182-D758-040, accesso n. DSM ACC2747, depositato il 17 Nov. 2005
- k. 182-D1106-061, accesso n. DSM ACC2748, depositato il 17 Nov. 2005
- l. 182-D1106-279, accesso n. DSM ACC2808, depositato il 26 Ott. 2006

m. 182-D1106-294, accesso n. DSM ACC2809, depositato il 26 Ott. 2006

n. 182-D1106-362, accesso n. DSM ACC2810, depositato il 26 Ott. 2006.

Anticorpi preferiti secondo l'insegnamento sono quelli prodotti e ottenibili dagli ibridomi sopra descritti; cioè 37G11 nel caso di 182-D1106-055, 37H8 nel caso di 182-D1106-056, 38G5 nel caso di 182-D1106-057, 38H3 nel caso di 182-D1106-058, 39F11 nel caso di 182-D1106-059, 43A11 nel caso di 182-D1106-062, 61C2 nel caso di 182-D1106-067, 26B5 nel caso di 182-D758-035, 26D12 nel caso di 182-D758-036, 28D10 nel caso di 182-D758-040, 42E12 nel caso di 182-D1106-061, 125E1 nel caso di 182-D1106-279, 163E12 nel caso di 182-D1106-294 e 175D10 nel caso di 182-D1106-362; e le loro forme chimerizzate e umanizzate.

Gli anticorpi chimerizzati preferiti e le loro sequenze sono mostrati nella tabella seguente.

	clone	mAb	Isotipo	regione variabile	anticorpo chimerizzato
catena pesante	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:14
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:15
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:16
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:18
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:17
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:19
catena leggera	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:21
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:20
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:22
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:25
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:24
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:23
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:26
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:27
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:28

In forme di realizzazione preferite, gli anticorpi, in particolare forme chimerizzate di anticorpi secondo l'invenzione, includono anticorpi comprendenti una regione costante di catena pesante (CH) comprendente una sequenza amminoacidica derivata da una regione costante di catena pesante umana, quale la sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 13 o un suo frammento. In altre forme di realizzazione preferite, gli anticorpi, in particolare forme chimerizzate di anticorpi secondo l'invenzione, includono anticorpi comprendenti una regione costante di catena leggera (CL)

comprendente una sequenza amminoacidica derivata da una regione costante di catena leggera umana, quale la sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 12 o un suo frammento. In una particolare forma di realizzazione preferita, gli anticorpi, in particolare forme chimerizzate di anticorpi secondo l'invenzione, includono anticorpi che comprendono una CH comprendente una sequenza amminoacidica derivata da una CH umana, quale la sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 13 o un suo frammento, e che comprendono una CL comprendente una sequenza amminoacidica derivata da una CL umana, quale la sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 12 o un suo frammento.

In una forma di realizzazione, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico di topo/uomo che comprende la catena leggera variabile murina kappa, l'allotipo Km(3) della regione costante della catena leggera kappa umana, la regione variabile della catena pesante murina, l'allotipo G1m(3) della regione costante di IgG1 umana.

In alcune forme di realizzazione preferite, le forme chimerizzate degli anticorpi includono anticorpi comprendenti una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 e un loro frammento e/o comprendente una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e un loro frammento.

In alcune forme di realizzazione preferite, le forme chimerizzate degli anticorpi includono anticorpi comprendenti una combinazione di catene pesanti e di catene leggere scelte dalle seguenti possibilità (i) a (ix):

(i) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 14 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 21 o da un suo frammento,

(ii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 15 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 20 o da un suo frammento,

(iii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 16 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 22 o da un suo frammento,

(iv) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 18 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 25 o da un suo frammento,

(v) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 17 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 24 o da un suo frammento,

(vi) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende

una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 23 o da un suo frammento,

(vii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 26 o da un suo frammento,

(viii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 27 o da un suo frammento, e

(ix) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 28 o da un suo frammento.

"Frammento" o "frammento di una sequenza amminoacidica" come sopra utilizzato si riferisce ad una parte di una sequenza di un anticorpo, vale a dire una sequenza che rappresenta la sequenza anticorpale abbreviata al terminale N e/o C, che quando sostituisce detta sequenza anticorpale in un anticorpo conserva il legame di detto anticorpo a CLDN18.2 e preferibilmente le funzioni di detto anticorpo come qui descritte, ad esempio la lisi mediata da CDC o la lisi mediata da ADCC. Preferibilmente, un frammento di una sequenza amminoacidica comprende almeno l'80%, preferibilmente almeno il 90%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98% o il 99% dei residui amminoacidici di detta sequenza amminoacidica. Un frammento di una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 si riferisce a detta sequenza in cui vengono rimossi 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoacidi al terminale N.

In una forma di realizzazione preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una regione variabile a catena pesante (VH) comprendente una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, e un loro frammento.

In una forma di realizzazione preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una regione variabile a catena leggera (VL) comprendente una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo consistente di SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, e un loro frammento.

In alcune forme di realizzazione preferite, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una combinazione di una regione variabile a catena pesante (VH) e di una regione variabile a catena leggera (VL) scelta dalle seguenti possibilità (i) a (ix):

(i) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 29 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 36 o da un suo frammento,

(ii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 30 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 35 o da un suo frammento,

(iii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 31 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza

amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 37 o da un suo frammento,

(iv) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 33 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 40 o da un suo frammento,

(v) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 32 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 39 o da un suo frammento,

(vi) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 38 o da un suo frammento,

(vii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 41 o da un suo frammento,

(viii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 42 o da un suo frammento,

(ix) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 43 o da un suo frammento.

In una forma di realizzazione preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una VH comprendente un set di regioni determinanti la complementarietà CDR1, CDR2 e CDR3 scelto dalle seguenti forme di realizzazione (i) a (vi):

(i) CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 14, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 14, CDR3: posizioni 116-125 di SEQ ID NO: 14,

(ii) CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 15, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 15, CDR3: posizioni 116-126 di SEQ ID NO: 15,

(iii) CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 16, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 16, CDR3: posizioni 116-124 di SEQ ID NO: 16,

(iv) CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 17, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 17, CDR3: posizioni 116-126 di SEQ ID NO: 17,

(v) CDR1: posizioni 44-51 di SEQ ID NO: 18, CDR2: posizioni 69-76 di SEQ ID NO: 18, CDR3: posizioni 115-125 di SEQ ID NO: 18, e

(vi) CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID NO: 19.

In una forma di realizzazione preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una VL comprendente un set di regioni determinanti la complementarietà CDR1, CDR2 e CDR3 scelto dalle seguenti forme di realizzazione (i) a (ix):

(i) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 20, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 20, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 20,

(ii) CDR1: posizioni 49-53 di SEQ ID NO: 21, CDR2: posizioni 71-73 di SEQ ID NO: 21, CDR3: posizioni 110-118 di SEQ ID NO: 21,

- (iii) CDR1: posizioni 47-52 di SEQ ID NO: 22, CDR2: posizioni 70-72 di SEQ ID NO: 22, CDR3: posizioni 109-117 di SEQ ID NO: 22,
- (iv) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 23, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 23, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 23,
- (v) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 24, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 24, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 24,
- (vi) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 25, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 25, CDR3: posizioni 115-122 di SEQ ID NO: 25,
- (vii) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 26, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 26, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 26,
- (viii) CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 27, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 27, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 27, e
- (ix) CDR1: posizioni 47-52 di SEQ ID NO: 28, CDR2: posizioni 70-72 di SEQ ID NO: 28, CDR3: posizioni 109-117 di SEQ ID NO: 28.

In una forma di realizzazione preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende una combinazione di VH e VL, ciascuna comprendente un set di regioni determinanti la complementarità CDR1, CDR2 e CDR3 scelto dalle seguenti forme di realizzazione (i) a (ix):

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

(ix) VH: CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID NO: 19, VL: CDR1: posizioni 47-52 di SEQ ID NO: 28, CDR2: posizioni 70-72 di SEQ ID NO: 28, CDR3: posizioni 109-117 di SEQ ID NO: 28.

In altre forme di realizzazione preferite, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende preferibilmente una o più delle regioni determinanti la complementarità (CDR), preferibilmente almeno la regione variabile CDR3 della regione variabile a catena pesante (VH) e/o della regione variabile a catena leggera (VL) di un anticorpo monoclonale contro CLDN18.2, preferibilmente di un anticorpo monoclonale contro CLDN18.2 qui descritto, e preferibilmente comprende una o più delle regioni determinanti la complementarità (CDR), preferibilmente almeno la regione variabile CDR3 delle regioni variabili a catena pesante (VH) e/o delle regioni variabili a catena leggera (VL) qui descritte. In una forma di realizzazione, dette una o più delle regioni determinanti la complementarità (CDR) sono scelte da un set di regioni determinanti la complementarità CDR1, CDR2 e CDR3 qui descritte. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, un anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 comprende preferibilmente le regioni determinanti la complementarità CDR1, CDR2 e CDR3 della regione variabile a catena pesante (VH) e/o della regione variabile a catena leggera (VL) di un anticorpo monoclonale contro CLDN18.2, preferibilmente di un anticorpo monoclonale contro CLDN18.2 qui descritto, e preferibilmente comprende le regioni determinanti la complementarità CDR1, CDR2 e CDR3 delle regioni variabili a catena pesante (VH) e/o delle regioni variabili a catena leggera (VL) qui descritte.

In una forma di realizzazione, un anticorpo comprendente una o più CDR, un set di CDR o una combinazione di set di CDR, come qui descritto, comprende dette CDR insieme alle regioni a cornice interposte tra di esse. Preferibilmente, la porzione comprenderà anche almeno circa il 50% di una o entrambe la prima e la quarta regione a cornice, il 50% essendo il 50% C-terminale della prima regione a cornice e il 50% N-terminale della quarta regione a cornice. La costruzione di anticorpi ottenuti mediante tecniche del DNA ricombinante può comportare l'introduzione di residui N o C-terminali nelle regioni variabili codificate da linker introdotti per facilitare il clonaggio o altre fasi di manipolazione, compresa l'introduzione di linker per unire regioni variabili qui descritte ad altre sequenze proteiche, tra cui catene pesanti di immunoglobuline, altri domini variabili (ad esempio nella produzione di "diabodies") o marcatori proteici.

In una forma di realizzazione, un anticorpo comprendente una o più CDR, un set di CDR o una combinazione di set di CDR, come qui descritto, comprende dette CDR in una cornice anticorpale umana.

Il presente riferimento ad un anticorpo che comprende, relativamente alla sua catena pesante, una particolare catena o una particolare regione o sequenza si riferisce preferibilmente alla situazione in cui tutte le catene pesanti di detto anticorpo comprendono detta particolare catena, regione o sequenza. Questo vale anche per la catena leggera di un anticorpo.

Con il termine "acido nucleico", come qui utilizzato, si intende includere DNA e RNA. Un acido nucleico può essere a filamento singolo o a filamento doppio, ma è preferibilmente un DNA a filamento doppio.

Secondo l'insegnamento, il termine "espressione" è utilizzato nel suo significato più ampio e comprende la produzione di RNA o di RNA e proteine/peptidi. Esso comprende anche un'espressione parziale di acidi nucleici. Inoltre, l'espressione può essere condotta in maniera transiente o stabile.

L'insegnamento qui fornito per quanto riguarda specifiche sequenze amminoacidiche, p.es. quelle mostrate nell'elenco delle sequenze, deve essere interpretato come riferito anche a varianti di dette sequenze specifiche che determinano sequenze funzionalmente equivalenti a dette sequenze specifiche, p.es. sequenze amminoacidiche che presentano proprietà identiche o simili a quelle delle sequenze amminoacidiche specifiche. Una proprietà importante è quella di mantenere il legame di un anticorpo al suo bersaglio o di sostenere le funzioni effettrici di un anticorpo. Preferibilmente, una sequenza che è una variante rispetto ad una sequenza specifica, quando sostituisce la sequenza specifica in un anticorpo, mantiene il legame di detto anticorpo a CLDN18.2 e, preferibilmente, le funzioni di detto anticorpo come qui descritto, p.es. la lisi mediata da CDC o la lisi mediata da ADCC.

Gli esperti del settore riconosceranno che in particolare le sequenze delle regioni CDR, ipervariabili e variabili possono essere modificate senza perdere la capacità di legame a CLDN18.2. Ad esempio, le regioni CDR saranno identiche o altamente omologhe alle regioni di anticorpi qui specificati. Con "altamente omologhe" si intende che nelle CDR possono essere effettuate 1 a 5, preferibilmente 1 a 4, come 1 a 3 o 1 o 2 sostituzioni. Inoltre, le regioni ipervariabili e variabili possono essere modificate in modo che mostrino una sostanziale omologia con le regioni di anticorpi qui specificamente descritti.

Per gli scopi della presente invenzione, "varianti" di una sequenza amminoacidica comprendono varianti di inserzione di aminoacidi, varianti di addizione di aminoacidi, varianti di delezione di aminoacidi e/o varianti di sostituzione di aminoacidi. Varianti di delezione di aminoacidi che comprendono la delezione all'estremità N-terminale e/o C-terminale della proteina sono anche denominate varianti di troncamento N-terminale e/o C-terminale.

Varianti di inserzione di aminoacidi comprendono inserzioni di uno o due o più aminoacidi in una particolare sequenza amminoacidica. Nel caso di varianti di sequenza amminoacidica aventi un'inserzione, uno o più residui amminoacidici sono inseriti in un particolare sito di una sequenza amminoacidica, sebbene sia possibile anche un inserimento casuale con screening appropriato del prodotto risultante.

Varianti di addizione di aminoacidi comprendono fusioni amino- e/o carbossi-terminali di uno o più aminoacidi, quali 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o più



aminoacidi.

Le varianti di delezione di aminoacidi sono caratterizzate dalla rimozione di uno o più aminoacidi dalla sequenza, ad esempio mediante rimozione di 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o più aminoacidi. Le delezioni possono essere in qualsiasi posizione della proteina.

Le varianti di sostituzione di aminoacidi sono caratterizzate dal fatto che almeno un residuo nella sequenza viene rimosso e un altro residuo viene inserito al suo posto. Si dà preferenza a modificazioni in posizioni della sequenza amminoacidica che non sono conservate tra proteine o peptidi omologhe/i e/o alla sostituzione di aminoacidi con altri aventi proprietà simili. Preferibilmente, le modificazioni amminoacidiche nelle varianti proteiche sono modificazioni amminoacidiche conservative, cioè sostituzioni di aminoacidi carichi o non carichi simili. Una modificazione amminoacidica conservativa comporta la sostituzione di uno di una famiglia di aminoacidi che sono correlati nelle loro catene laterali. Gli aminoacidi naturali sono generalmente suddivisi in quattro famiglie: aminoacidi acidi (aspartato, glutammato), basici (lisina, arginina, istidina), non polari (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano) e polari non carichi (glicina, asparagina, glutammina, cisteina, serina, treonina, tirosina). Fenilalanina, triptofano e tirosina sono talvolta classificati insieme come aminoacidi aromatici.

Preferibilmente, il grado di similarità, preferibilmente di identità, tra una data sequenza amminoacidica e una sequenza amminoacidica che è una variante di detta sequenza amminoacidica data sarà almeno di circa 60%, 65%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Il grado di similarità o identità è dato preferibilmente per una regione amminoacidica che è almeno circa il 10%, almeno circa il 20%, almeno circa il 30%, almeno circa il 40%, almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90% o circa il 100% dell'intera lunghezza della sequenza amminoacidica di riferimento. Ad esempio, se la sequenza amminoacidica di riferimento consiste di 200 aminoacidi, il grado di similarità o identità è dato preferibilmente per almeno circa 20, almeno circa 40, almeno circa 60, almeno circa 80, almeno circa 100, almeno circa 120, almeno circa 140, almeno circa 160, almeno circa 180, o circa 200 aminoacidi, preferibilmente aminoacidi continui. In forme di realizzazione preferite, il grado di similarità o identità è dato per l'intera lunghezza della sequenza amminoacidica di riferimento. L'allineamento per determinare la similarità di sequenza, preferibilmente l'identità di sequenza, può essere effettuato con strumenti noti nell'arte, preferibilmente utilizzando l'allineamento di sequenze migliore, ad esempio utilizzando Align con impostazioni standard, preferibilmente EMBOSS::needle, Matrice: Blosum62, Apertura di Gap 10,0, Estensione di Gap 0,5.

“Similarità di sequenza” indica la percentuale di aminoacidi che sono identici o che rappresentano sostituzioni amminoacidiche conservative. “Identità di sequenza” tra due sequenze amminoacidiche indica la percentuale di aminoacidi identici tra le sequenze.

Con il termine "identità percentuale" si intende indicare una percentuale di residui amminoacidici che sono identici tra le due sequenze da confrontare,

ottenute dopo il miglior allineamento, questa percentuale essendo puramente statistica e le differenze tra le due sequenze essendo distribuite in modo casuale e su tutta la loro lunghezza. I confronti di sequenza tra due sequenze amminoacidiche vengono eseguiti convenzionalmente confrontando queste sequenze dopo averle allineate in modo ottimale, detto confronto essendo effettuato per segmento o per "finestra di confronto" per identificare e confrontare regioni locali di similarità di sequenza. L'allineamento ottimale delle sequenze per il confronto può essere prodotto, oltre che manualmente, mediante l'algoritmo di omologia locale di Smith e Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, mediante l'algoritmo di omologia locale di Needleman e Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante il metodo della ricerca di similarità di Pearson e Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programmi informatici che utilizzano questi algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N e TFASTA nel pacchetto Wisconsin Genetics Software, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

L'identità percentuale viene calcolata determinando il numero di posizioni identiche tra le due sequenze confrontate, dividendo questo numero per il numero di posizioni confrontate e moltiplicando il risultato ottenuto per 100 così da ottenere l'identità percentuale tra queste due sequenze.

Il termine "animale transgenico" si riferisce ad un animale avente un genoma che comprende uno o più transgeni, preferibilmente transgeni di catene pesanti e/o leggere, o transcromosomi (integrati o non integrati nel DNA genomico naturale dell'animale) e che è preferibilmente in grado di esprimere i transgeni. Ad esempio, un topo transgenico può avere un transgene di catena leggera umana e o un transgene di catena pesante umana o un transcromosoma di catena pesante umana, in modo tale che il topo produca anticorpi umani anti-CLDN18.2 quando immunizzato con l'antigene CLDN18.2 e/o con cellule che esprimono CLDN18.2. Il transgene della catena pesante umana può essere integrato nel DNA cromosomico del topo, come avviene per i topi transgenici, p.es. i topi HuMAb, come i topi HCo7 o HCo12, oppure il transgene della catena pesante umana può essere mantenuto in posizione extra-cromosomica, così come nel caso dei topi transcromosomici (p.es. KM) descritti in WO 02/43478. Tali topi transgenici e transcromosomici possono essere in grado di produrre una pluralità di isotipi di anticorpi monoclonali umani contro CLDN18.2 (p.es., IgG, IgA e/o IgE) mediante ricombinazione V-D-J e commutazione di isotipi.

"Ridurre", "diminuire" o "inibire", come qui utilizzato, significa una diminuzione complessiva o la capacità di causare una diminuzione complessiva, preferibilmente del 5% o superiore, del 10% o superiore, del 20% o superiore, più preferibilmente del 50% o superiore e, di massima preferenza, del 75% o superiore del livello, p.es. del livello di espressione o del livello di proliferazione delle cellule.

Termini quali "aumentare" o "intensificare" preferibilmente si riferiscono ad un aumento o ad un'intensificazione di almeno circa il 10%, preferibilmente almeno il 20%, preferibilmente almeno il 30%, più preferibilmente almeno il 40%, più preferibilmente almeno il 50%, ancora più preferibilmente almeno l'80% e, di massima preferenza, almeno il 100%, almeno il 200%, almeno il 500%, almeno il 1000%, almeno il 10000% o

addirittura superiore.

#### **Meccanismi di azione dei mAb**

Gli anticorpi qui descritti preferibilmente interagiscono con componenti del sistema immunitario, preferibilmente tramite ADCC o CDC. Gli anticorpi qui descritti possono anche essere utilizzati per indirizzare i carichi utili (p.es. radioisotopi, farmaci o tossine) per uccidere direttamente le cellule tumorali oppure possono essere utilizzati sinergicamente con agenti chemioterapeutici tradizionali, attaccando i tumori attraverso meccanismi di azione complementari che possono includere risposte immunitarie anti-tumore che possono essere state compromesse a causa di effetti collaterali citotossici degli agenti chemioterapici sui linfociti T. Comunque, gli anticorpi qui descritti possono anche esercitare un effetto semplicemente legandosi a CLDN18.2 sulla superficie cellulare, quindi, p.es. bloccando la proliferazione delle cellule.

#### **Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente**

La ADCC descrive la capacità di uccisione cellulare delle cellule effettrici, come qui descritto, in particolare dei linfociti, che preferibilmente necessita che la cellula bersaglio sia marcata da un anticorpo.

La ADCC si verifica preferibilmente quando gli anticorpi si legano agli antigeni sulle cellule tumorali e i domini anticorpali Fc impegnano i recettori di Fc (FcR) sulla superficie delle cellule immunitarie effettrici. Sono state identificate diverse famiglie di recettori di Fc e specifiche popolazioni cellulari esprimono in maniera caratteristica definiti recettori di Fc. La ADCC può essere considerata come un meccanismo per indurre direttamente un grado variabile di distruzione tumorale immediata che porta alla presentazione dell'antigene e all'induzione di risposte di cellule T tumore-dirette. Preferibilmente, l'induzione *in vivo* della ADCC porterà a risposte di cellule T tumore-dirette ed a risposte anticorpali derivate dall'ospite.

#### **Citotossicità complemento-dipendente**

La CDC è un altro metodo di uccisione cellulare che può essere diretto da anticorpi. L'IgM è l'isotipo più efficace per l'attivazione del complemento. IgG1 e IgG3 sono entrambi molto efficaci nel dirigere la CDC attraverso la via di attivazione del complemento classica. Preferibilmente, in questa cascata, la formazione di complessi di antigene-anticorpo provoca lo smascheramento di più siti di legame a C1q in stretta prossimità sui domini  $C_{H2}$  delle molecole anticorpali coinvolte, quali le molecole IgG (C1q è uno dei tre sotto-componenti del complemento C1). Preferibilmente, questi siti di legame a C1q smascherati convertono l'interazione precedente C1q-IgG a bassa affinità in una ad alta avidità, che innesca una cascata di eventi che coinvolge una serie di altre proteine del complemento e porta al rilascio proteolitico degli agenti chemiotattici/attivanti C3a e C5a delle cellule effettrici. Preferibilmente, la cascata del complemento termina nella formazione di un complesso di attacco alla membrana, che crea pori nella membrana cellulare che facilitano il passaggio libero di acqua e soluti dentro e fuori dalla cellula.

Gli anticorpi qui descritti possono essere prodotti attraverso una varietà di tecniche, tra cui la metodologia convenzionale degli anticorpi monoclonali, per esempio la tecnica standard di ibridazione delle cellule somatiche di Kohler e Milstein, Nature 256: 495 (1975). Sebbene si preferiscano procedure di ibridazione delle cellule somatiche, in linea di principio possono essere impiegate altre tecniche per la produzione di anticorpi monoclonali, ad esempio la trasformazione virale o oncogena di linfociti B o tecniche di display su fago con utilizzo di librerie di geni anticorpali.

Il sistema animale preferito per la preparazione di ibridomi che secernono anticorpi monoclonali è il sistema murino. La produzione di un ibridoma nel topo è una procedura ben consolidata. Protocolli di immunizzazione e tecniche di isolamento degli splenociti immunizzati per la fusione sono noti nell'arte. Sono noti anche partner di fusione (p.es. cellule di mieloma murino) e procedure di fusione.

Altri sistemi animali preferiti per la preparazione di ibridomi che secernono anticorpi monoclonali sono i sistemi di ratto e di coniglio (p.es. descritti in Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9348 (1995), si veda anche Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

In un'altra forma di realizzazione preferita, gli anticorpi monoclonali umani possono essere generati utilizzando topi transgenici o transcromosomici che portano parti del sistema immunitario umano anziché il sistema del topo. Questi topi transgenici e transcromosomici comprendono rispettivamente topi noti come topi HuMAb e topi KM, e sono qui definiti collettivamente "topi transgenici". La produzione di anticorpi umani in tali topi transgenici può essere eseguita come descritto in dettaglio per CD20 in WO2004 035607.

Un'altra strategia ancora per la generazione di anticorpi monoclonali è quella di isolare direttamente geni codificanti anticorpi da linfociti che producono anticorpi di specificità definita, p.es. si veda Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Per dettagli sull'ingegneria ricombinante degli anticorpi si vedano anche Welschof and Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 e Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Per generare anticorpi, i topi possono essere immunizzati con peptidi coniugati a veicoli, derivati dalla sequenza antigenica, vale a dire la sequenza contro cui devono essere indirizzati gli anticorpi, una preparazione arricchita dell'antigene o di suoi frammenti espressi in maniera ricombinante e/o di cellule che esprimono l'antigene, come descritto. In alternativa, i topi possono essere immunizzati con DNA che codifica l'antigene o suoi frammenti. Nel caso in cui le immunizzazioni con una preparazione purificata o arricchita dell'antigene non diano anticorpi, i topi possono anche essere immunizzati con cellule che esprimono l'antigene, ad esempio una linea cellulare, per promuovere risposte immunitarie.

La risposta immunitaria può essere monitorata nel corso del protocollo di immunizzazione con campioni di plasma e siero ottenuti dalla vena della coda o mediante prelievi retro-orbitali. I topi con titoli sufficienti di immunoglobulina possono essere utilizzati per le fusioni. I topi possono essere sottoposti a richiamo per via intraperitoneale o endovenosa con cellule che esprimono l'antigene 3 giorni prima del sacrificio e dell'asportazione della

milza per aumentare la percentuale di ibridomi secernenti anticorpi specifici.

Per generare ibridomi che producono anticorpi monoclonali, splenociti e cellule linfonodali di topi immunizzati possono essere isolati e fusi ad una linea cellulare immortalizzata appropriata, ad esempio una linea cellulare di mieloma di topo. Gli ibridomi risultanti possono quindi essere sottoposti a screening per la produzione di anticorpi antigene-specifici. Pozzetti singoli possono quindi essere sottoposti a screening mediante ELISA per ibridomi secernenti anticorpi. Anticorpi con specificità per l'antigene possono essere identificati tramite immunofluorescenza e analisi FACS utilizzando cellule che esprimono l'antigene. Gli ibridomi secernenti l'anticorpo possono essere nuovamente piastrati, di nuovo sottoposti a screening e, se ancora positivi per gli anticorpi monoclonali, possono essere subclonati mediante diluizione limitante. I subcloni stabili possono quindi essere coltivati in vitro per generare anticorpi in terreno di coltura tissutale per la caratterizzazione.

Gli anticorpi possono essere anche prodotti in un trasfettoma di cellule ospiti utilizzando, ad esempio, una combinazione di tecniche del DNA ricombinante e di metodi di trasfezione genica ben noti nell'arte (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Ad esempio, in una forma di realizzazione, il/i gene/i di interesse, p.es. geni anticorpali, può/possono essere legato/i in un vettore di espressione, quale un plasmide di espressione eucariotica come utilizzato dal sistema di espressione genica GS descritto in WO 87/04462, WO 89/01036 ed EP 338 841 o altri sistemi di espressione ben noti nell'arte. Il plasmide purificato con i geni anticorpali clonati può essere introdotto in cellule ospiti eucariotiche, quali cellule CHO, cellule NS/0, cellule HEK293T o cellule HEK293, o in alternativa in altre cellule eucariotiche, quali cellule vegetali, cellule fungine o di lievito. Il metodo impiegato per introdurre questi geni può essere rappresentato da metodi descritti nell'arte, quali elettroporazione, lipofectina, lipofectamina o altri. Dopo l'introduzione di questi geni anticorpali nelle cellule ospiti, le cellule che esprimono l'anticorpo possono essere identificate e selezionate. Queste cellule rappresentano i trasfettomi che possono poi essere amplificati per il loro livello di espressione e portati su scala maggiore per produrre anticorpi. Gli anticorpi ricombinanti possono essere isolati e purificati da questi supernatanti di coltura e/o da queste cellule.

In alternativa, i geni anticorpali clonati possono essere espressi in altri sistemi di espressione, tra cui cellule procariotiche, quali microrganismi, p.es. E. coli. Inoltre, gli anticorpi possono essere prodotti in animali transgenici non umani, come nel latte di pecore e conigli o nelle uova di galline, o in piante transgeniche; si vedano p.es. Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; e Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

Chimerizzazione

Gli anticorpi monoclonali murini possono essere utilizzati come anticorpi terapeutici nell'uomo quando etichettati con tossine o con isotopi radioattivi.

Gli anticorpi murini non etichettati sono altamente immunogenici nell'uomo quando applicati ripetutamente, portando alla riduzione dell'effetto terapeutico. L'immunogenicità principale è mediata dalle regioni costanti della catena pesante. L'immunogenicità degli anticorpi murini nell'uomo può essere ridotta o completamente evitata se i rispettivi anticorpi vengono chimerizzati o umanizzati. Gli anticorpi chimerici sono anticorpi, le cui diverse porzioni sono derivate da diverse specie animali, come quelle che hanno una regione variabile derivata da un anticorpo murino e una regione costante di immunoglobulina umana. La chimerizzazione degli anticorpi viene ottenuta mediante unione delle regioni variabili delle catene pesanti e leggere dell'anticorpo murino con la regione costante delle catene umane pesanti e leggere (ad esempio come descritto da Kraus et al., In *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi chimerici vengono generati unendo la regione costante della catena leggera kappa umana alla regione variabile della catena leggera murina. In un'altra forma di realizzazione preferita, gli anticorpi chimerici possono essere generati unendo la regione costante della catena leggera lambda umana alla regione variabile della catena leggera murina. Le regioni costanti di catena pesante preferite per la generazione di anticorpi chimerici sono IgG1, IgG3 e IgG4. Altre regioni costanti di catena pesante preferite per la generazione di anticorpi chimerici sono IgG2, IgA, IgD e IgM.

#### Umanizzazione

Gli anticorpi interagiscono con antigeni bersaglio prevalentemente attraverso residui amminoacidici che si trovano nelle sei regioni determinanti la complementarità (CDR) a catena pesante e leggera. Per questo motivo, le sequenze amminoacidiche all'interno delle CDR sono più diverse tra singoli anticorpi rispetto a sequenze esterne alle CDR. Poiché le sequenze delle CDR sono responsabili della maggior parte delle interazioni anticorpo-antigene, è possibile esprimere anticorpi ricombinanti che mimano le proprietà di specifici anticorpi naturali costruendo vettori di espressione che includono sequenze CDR dallo specifico anticorpo naturale innestate su sequenze di cornice di un anticorpo differente con proprietà differenti (si vedano, p.es., Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; e Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033). Tali sequenze di cornice possono essere ottenute da database pubblici di DNA che comprendono sequenze di geni anticorpali della linea germinale. Queste sequenze della linea germinale saranno differenti da sequenze di geni anticorpali maturi perché non comprendono geni variabili completamente assemblati, che vengono formati mediante giunzione V(D)J durante la maturazione delle cellule B. Le sequenze geniche della linea germinale differiranno anche dalle sequenze di un anticorpo di repertorio secondario ad alta affinità in modo individuale, uniformemente in tutta la regione variabile.

La capacità degli anticorpi di legare un antigene può essere determinata utilizzando saggi di legame standard (p.es. ELISA, Western Blot, Immunofluorescenza ed analisi tramite citometria a flusso).

Per purificare gli anticorpi, ibridomi selezionati possono essere coltivati in matracci rotanti da due litri per la purificazione di anticorpi monoclonali. In alternativa, gli anticorpi possono essere prodotti in bioreattori per dialisi. I supernatanti possono essere filtrati e, se necessario, concentrati prima di una cromatografia di affinità con proteina G-sepharose o proteina A-sepharose. L'IgG eluita può essere controllata mediante elettroforesi su gel e cromatografia liquida ad alta prestazione per garantirne la purezza. La soluzione tampone può essere scambiata con PBS e la concentrazione può essere determinata mediante OD280 utilizzando un coefficiente di estinzione di 1,43. Gli anticorpi monoclonali possono essere aliquotati e conservati a -80°C.

Per determinare se gli anticorpi monoclonali selezionati si leghino a specifici epitopi, si può utilizzare una mutagenesi sito-diretta o una mutagenesi diretta a più siti.

Per determinare l'isotipo degli anticorpi, è possibile eseguire delle ELISA per isotipo con vari corredi commerciali (ad esempio Zymed, Roche Diagnostics). I pozzetti di piastre per microtitolazione possono essere rivestiti con Ig anti-topo. Dopo la saturazione, le piastre vengono fatte reagire con anticorpi monoclonali o con controlli di isotipi purificati a temperatura ambiente per due ore. I pozzetti possono quindi essere fatti reagire con sonde coniugate con perossidasi specifiche per IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, IgA o IgM di topo. Dopo il lavaggio, le piastre possono essere sviluppate con substrato ABTS (1 mg/ml) e analizzate a OD di 405-650. In alternativa, può essere utilizzato il "IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit" (Roche, Cat. n. 1493027) come descritto dal produttore.

Per dimostrare la presenza di anticorpi in sieri di topi immunizzati o il legame di anticorpi monoclonali a cellule vive che esprimono l'antigene, può essere utilizzata la citometria a flusso. Linee cellulari che esprimono l'antigene naturalmente o in seguito a trasfezione e controlli negativi privi di espressione dell'antigene (coltivate in condizioni di crescita standard) possono essere miscelate con varie concentrazioni di anticorpi monoclonali in supernatanti di ibridoma o in PBS contenente 1% FBS e possono essere incubate a 4°C per 30 minuti. Dopo il lavaggio, all'anticorpo monoclonale legato all'antigene può essere legato l'anticorpo anti-IgG marcato con APC o Alexa647 nelle stesse condizioni che per la colorazione con l'anticorpo primario. I campioni possono essere analizzati mediante citometria a flusso con uno strumento FACS che utilizza proprietà di diffusione della luce e di diffusione laterale per la selezione di singole cellule viventi. Al fine di distinguere gli anticorpi monoclonali antigene-specifici da leganti non specifici in una singola misurazione, può essere impiegato il metodo della co-trasfezione. Cellule trasfettate in maniera transiente con plasmidi codificanti l'antigene e un marcatore fluorescente possono essere colorate come descritto sopra. Le cellule trasfettate possono essere rivelate in un canale di fluorescenza differente rispetto alle cellule colorate con anticorpi. Poiché la maggior parte delle cellule trasfettate esprime entrambi i transgeni, gli anticorpi monoclonali antigene-specifici si legano di preferenza a cellule esprimenti il marcatore di fluorescenza, mentre gli anticorpi

non specifici si legano in percentuale paragonabile a cellule non trasfettate. È possibile utilizzare un saggio alternativo tramite microscopia a fluorescenza in aggiunta o al posto del saggio mediante citometria a flusso. Le cellule possono essere colorate esattamente come descritto sopra ed esaminate mediante microscopia a fluorescenza.

Per dimostrare la presenza di anticorpi in sieri di topi immunizzati o il legame di anticorpi monoclonali a cellule vive che esprimono l'antigene, può essere utilizzata un'analisi tramite microscopia ad immunofluorescenza. Ad esempio, linee cellulari che esprimono l'antigene spontaneamente o in seguito a trasfezione e controlli negativi privi di espressione dell'antigene vengono coltivate in vetrini a camera in condizioni di crescita standard in terreno DMEM/F12 integrato con 10% siero di vitello fetale (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 IU/ml penicillina e 100 µg/ml streptomina. Le cellule possono quindi essere fissate con metanolo o paraformaldeide oppure non trattate. Le cellule possono quindi essere fatte reagire con anticorpi monoclonali contro l'antigene per 30 min. a 25°C. Dopo il lavaggio, le cellule possono essere fatte reagire con un anticorpo secondario anti-IgG di topo marcato con Alexa555 (Molecular Probes) nelle stesse condizioni. Le cellule possono quindi essere esaminate mediante microscopia a fluorescenza.

Estratti cellulari di cellule che esprimono l'antigene e di controlli negativi appropriati possono essere preparati e sottoposti a elettroforesi in gel di poliaccrilammide con sodio dodecil solfato (SDS). Dopo l'elettroforesi, gli antigeni separati saranno trasferiti su membrane di nitrocellulosa, che saranno saturate e sondate con gli anticorpi monoclonali da testare. Il legame dell'IgG può essere rivelato utilizzando anti-IgG di topo con perossidasi e sviluppo con il substrato ECL.

Gli anticorpi possono essere ulteriormente testati per la reattività con l'antigene mediante immunostochimica in maniera ben nota all'esperto, p.es. utilizzando criosezioni fissate in paraformaldeide o acetone o sezioni di tessuto incluse in paraffina fissate con paraformaldeide derivanti da campioni di tessuto non canceroso o di tessuto canceroso ottenuti da pazienti durante procedure chirurgiche di routine o da topi portanti tumori xeno-innestati inoculati con linee cellulari che esprimono l'antigene spontaneamente o in seguito a trasfezione. Per l'immunocolorazione, gli anticorpi reattivi con l'antigene possono essere incubati, a cui è seguita incubazione con anticorpi di capra anti-topo o anti-coniglio coniugati a perossidasi di rafano (DAKO) secondo le istruzioni dei fornitori.

Gli anticorpi possono essere testati per la loro capacità di mediare la fagocitosi e l'uccisione di cellule esprimenti CLDN18.2. Il test dell'attività degli anticorpi monoclonali in vitro fornirà uno screening iniziale prima del test di modelli in vivo.

*Citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC):*

In breve, cellule polimorfonucleate (PMN), cellule NK, monociti, cellule mononucleate o altre cellule effettrici, provenienti da donatori sani, possono



essere purificate mediante centrifugazione di densità in Ficoll Hypaque, seguita da lisi di eritrociti contaminanti. Le cellule effettrici lavate possono essere sospese in RPMI integrato con 10% siero di vitello fetale termo-inattivato o, alternativamente, con 5% siero umano termo-inattivato e mescolate con cellule bersaglio marcate con  $^{51}\text{Cr}$  che esprimono CLDN18.2, in vari rapporti tra cellule effettrici e cellule bersaglio. In alternativa, le cellule bersaglio possono essere marcate con un ligando intensificante la fluorescenza (BATDA). Un chelato altamente fluorescente di Europio con il ligando intensificante, che viene rilasciato dalle cellule morte, può essere misurato con un fluorimetro. Un'altra tecnica alternativa può utilizzare la trasfezione delle cellule bersaglio con luciferasi. Il giallo luciferino aggiunto può poi essere ossidato solo dalle cellule vive. Possono poi essere aggiunte IgG purificate anti-CLDN18.2 a diverse concentrazioni. Una IgG umana irrilevante può essere utilizzata come controllo negativo. I saggi possono essere effettuati per 4 a 20 ore a  $37^\circ\text{C}$  a seconda del tipo di cellula effettrice utilizzata. I campioni possono essere analizzati per la citolisi misurando il rilascio di  $^{51}\text{Cr}$  o la presenza del chelato EuTDA nel supernatante di coltura. In alternativa, la luminescenza derivante dall'ossidazione del giallo luciferino può essere una misura delle cellule vive.

Gli anticorpi monoclonali anti-CLDN18.2 possono anche essere testati in varie combinazioni per determinare se la citolisi venga intensificata con una pluralità di anticorpi monoclonali.

*Citotossicità complemento-dipendente (CDC):*

Gli anticorpi monoclonali anti-CLDN18.2 possono essere testati per la loro capacità di mediare la CDC utilizzando una varietà di tecniche note. Ad esempio, il siero per il complemento può essere ottenuto dal sangue in maniera nota all'esperto. Per determinare l'attività CDC dei mAb, possono essere utilizzati diversi metodi. Può essere per esempio misurato il rilascio di  $^{51}\text{Cr}$  oppure l'elevata permeabilità della membrana può essere valutata utilizzando un saggio di esclusione di ioduro di propidio (PI). In breve, cellule bersaglio possono essere lavate e  $5 \times 10^5/\text{ml}$  possono essere incubate con diverse concentrazioni di mAb per 10-30 min. a temperatura ambiente o a  $37^\circ\text{C}$ . Può essere poi aggiunto siero o plasma ad una concentrazione finale del 20% (v/v) e le cellule possono essere incubate a  $37^\circ\text{C}$  per 20-30 minuti. Tutte le cellule di ogni campione possono essere aggiunte alla soluzione di PI in un tubo per FACS. La miscela può quindi essere analizzata immediatamente mediante analisi tramite citometria a flusso utilizzando FACSArray.

In un saggio alternativo, l'induzione della CDC può essere determinata su cellule adese. In una forma di realizzazione di questo saggio, le cellule vengono seminate 24 h prima del saggio a una densità di  $3 \times 10^4/\text{pozzetto}$  in piastre per microtitolazione di coltura tissutale a fondo piatto. Il giorno successivo il terreno di crescita viene rimosso e le cellule vengono incubate in triplicato con anticorpi. Cellule di controllo vengono incubate con terreno di crescita o terreno di crescita contenente 0,2% saponina per la determinazione rispettivamente della lisi basale e della lisi massima. Dopo

incubazione per 20 min. a temperatura ambiente, il supernatante viene rimosso ed alle cellule viene aggiunto 20% (v/v) plasma umano o siero in DMEM (preriscaldato fino a 37°C) e il tutto viene incubato per altri 20 min. a 37°C. Tutte le cellule di ogni campione vengono aggiunte alla soluzione di ioduro di propidio (10 µg/ml). Successivamente, i supernatanti vengono sostituiti da PBS contenente 2,5 µg/ml bromuro di etidio e l'emissione della fluorescenza dopo eccitazione a 520 nm viene misurata a 600 nm utilizzando un Tecan Safire. La percentuale di lisi specifica viene calcolata come segue: % lisi specifica = (fluorescenza campione-fluorescenza sfondo) / (fluorescenza lisi massima-fluorescenza sfondo) x 100.

*Induzione di apoptosi e inibizione della proliferazione cellulare con anticorpi monoclonali:*

Per verificare la capacità di innescare l'apoptosi, gli anticorpi monoclonali anti-CLDN18.2 possono essere incubati, ad esempio, con cellule tumorali CLDN18.2-positive, p.es. cellule tumorali SNU-16, DAN-G, KATO-III o trasfettate con CLDN18.2 a 37°C per circa 20 ore. Le cellule possono essere raccolte, lavate in tampone di legame ad Annexina V (BD biosciences) e incubate con Annexina V coniugata a FITC o APC (BD biosciences) per 15 min. al buio. Tutte le cellule di ciascun campione possono essere aggiunte alla soluzione di PI (10 µg/ml in PBS) in un tubo per FACS e analizzate immediatamente mediante citometria a flusso (come sopra). In alternativa, un'inibizione generale della proliferazione cellulare mediante anticorpi monoclonali può essere rivelata con corredi disponibili in commercio. Il corredo di proliferazione cellulare DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. n. AD0200) è un saggio immunologico non isotopico basato sulla misurazione dell'incorporazione di 5-bromo-2'-desossiridina (BrdU) durante la sintesi del DNA delle cellule in via di proliferazione nelle micropiastre. La BrdU incorporata viene rivelata utilizzando un anticorpo monoclonale marcato con europio. Per consentire la rivelazione degli anticorpi, le cellule vengono fissate e il DNA viene denaturato utilizzando la soluzione Fix. L'anticorpo non legato viene lavato via e viene aggiunto l'induttore DELFIA per dissociare gli ioni di europio dall'anticorpo marcato in soluzione, dove formano chelati altamente fluorescenti con componenti dell'induttore DELFIA. La fluorescenza misurata - utilizzando la fluorimetria risolta nel tempo per la rivelazione - è proporzionale alla sintesi del DNA nella cellula di ciascun pozzetto.

**Studi preclinici**

Gli anticorpi monoclonali che si legano a CLDN18.2 possono anche essere testati in un modello in vivo (p.es. in topi immunodeficienti con tumori xeno-trapiantati inoculati con linee cellulari esprimenti CLDN18.2, p.es. DAN-G, SNU-16 o KATO-III, o in seguito a trasfezione, p.es. HEK293) per determinare la loro efficacia nel controllo della crescita di cellule tumorali esprimenti CLDN18.2.

Utilizzando gli anticorpi qui descritti possono essere condotti degli studi in vivo dopo xeno-trapianto di cellule tumorali esprimenti CLDN18.2 in topi immunocompromessi o in altri animali. Gli anticorpi possono essere somministrati a topi privi di tumori, seguito da iniezione di cellule tumorali per misurare gli effetti degli anticorpi sulla prevenzione della formazione di tumori o di sintomi correlati ai tumori. Gli anticorpi possono essere

somministrati a topi affetti da tumori per determinare l'efficacia terapeutica dei rispettivi anticorpi nel ridurre la crescita tumorale, la metastasi o sintomi correlati ai tumori. L'applicazione degli anticorpi può essere combinata con l'applicazione di altre sostanze, quali farmaci citostatici, inibitori di fattori di crescita, bloccanti del ciclo cellulare, inibitori dell'angiogenesi o altri anticorpi, per determinare l'efficacia sinergica e la potenziale tossicità delle combinazioni. Per analizzare gli effetti collaterali tossici mediati dagli anticorpi, negli animali possono essere inoculati anticorpi o reagenti di controllo ed essi possono essere esaminati accuratamente per sintomi eventualmente correlati alla terapia con anticorpi contro CLDN18.2. Possibili effetti collaterali dell'applicazione in vivo di anticorpi contro CLDN18.2 includono in particolare la tossicità a livello di tessuti che esprimono CLDN18.2, ivi incluso lo stomaco. Anticorpi che riconoscono CLDN18.2 nella specie umana e in altre specie, p.es. nei topi, sono particolarmente utili per prevedere potenziali effetti collaterali mediati dall'applicazione di anticorpi monoclonali contro CLDN18.2 negli esseri umani.

La mappatura di epitopi riconosciuti da anticorpi può essere condotta come descritto in dettaglio in "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) di Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 e in "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 di Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

I composti e gli agenti qui descritti possono essere somministrati nella forma di qualsiasi composizione farmaceutica adatta.

Le composizioni farmaceutiche sono solitamente fornite in forma di dosaggio unitaria e possono essere preparate in una maniera di per sé nota. Una composizione farmaceutica può essere p.es. nella forma di una soluzione o di una sospensione.

Una composizione farmaceutica può comprendere sali, sostanze tamponanti, conservanti, veicoli, diluenti e/o eccipienti, tutti i quali sono preferibilmente farmaceuticamente accettabili. Il termine "farmaceuticamente accettabile" si riferisce all'assenza di tossicità di un materiale che non interagisce con l'azione del principio attivo della composizione farmaceutica.

Sali che non sono farmaceuticamente accettabili possono essere utilizzati per la preparazione di sali farmaceuticamente accettabili e sono inclusi nell'insegnamento. Sali farmaceuticamente accettabili di questo tipo comprendono, in modo non limitante, quelli preparati dai seguenti acidi: gli acidi cloridrico, bromidrico, solforico, nitrico, fosforico, maleico, acetico, salicilico, citrico, formico, malonico e succinico. Sali farmaceuticamente accettabili possono essere preparati anche sotto forma di sali di metalli alcalini o di sali di metalli alcalino-terrosi, quali sali di sodio, sali di potassio o sali di calcio.

Sostanze tamponanti adatte per utilizzo in una composizione farmaceutica includono acido acetico in un sale, acido citrico in un sale, acido borico in un sale e acido fosforico in un sale.

Conservanti adatti per utilizzo in una composizione farmaceutica includono cloruro di benzalconio, clorobutanolo, paraben e timerosal.

Una formulazione iniettabile può comprendere un eccipiente farmaceuticamente accettabile, quale lattato di Ringer.

Il termine "veicolo" si riferisce ad un componente organico o inorganico, naturale o sintetico, in cui il componente attivo viene combinato per facilitare, migliorare o consentire l'applicazione. Secondo l'insegnamento, il termine "veicolo" include anche uno o più riempitivi, sostanze diluenti o incapsulanti, compatibili, solidi o liquidi, idonei per la somministrazione a un paziente.

Possibili sostanze veicolanti per la somministrazione parenterale sono, p.es., acqua sterile, Ringer, lattato di Ringer, soluzione sterile di cloruro di sodio, glicoli polialchilenici, naftaleni idrogenati e, in particolare, polimeri di lattidi biocompatibili, polimeri di lattidi/glicolidi o copolimeri di poliossietilene/poliossipropilene.

Con il termine "eccipiente", quando qui utilizzato, si intende indicare tutte le sostanze che possono essere presenti in una composizione farmaceutica e che non sono ingredienti attivi, quali, p.es., veicoli, leganti, lubrificanti, addensanti, agenti tensioattivi, conservanti, emulsionanti, tamponi, agenti aromatizzanti o coloranti.

Gli agenti e le composizioni descritti nella presente possono essere somministrati attraverso qualsiasi via convenzionale, quale la somministrazione parenterale, come tramite iniezione o infusione. La somministrazione è preferibilmente parenterale, p.es. endovenosa, endoarteriosa, sottocutanea, intradermica o intramuscolare.

Composizioni adatte per la somministrazione parenterale comprendono solitamente una preparazione acquosa o non acquosa sterile del composto attivo, che è preferibilmente isotonica rispetto al sangue del ricevente. Esempi di veicoli e solventi compatibili sono la soluzione di Ringer e la soluzione isotonica di cloruro di sodio. Inoltre, come mezzi di soluzione o di sospensione, si utilizzano solitamente degli oli fissi sterili.

Gli agenti e le composizioni qui descritti vengono somministrati in quantità efficaci. Una "quantità efficace" si riferisce alla quantità che ottiene una reazione desiderata o un effetto desiderato da sola o insieme ad ulteriori dosi. Nel caso di trattamento di una particolare malattia o di una particolare condizione, la reazione desiderata si riferisce preferibilmente all'inibizione della progressione della malattia. Ciò comporta il rallentamento dell'avanzare della malattia e, in particolare, l'interruzione o l'inversione dell'avanzare della malattia. La reazione desiderata in un trattamento di una malattia o di una condizione può anche essere un ritardo dell'insorgenza o una prevenzione dell'insorgenza di detta malattia o di detta condizione.

Una quantità efficace di un agente o di una composizione qui descritto/a dipenderà dalla condizione da trattare, dalla gravità della malattia, dai singoli parametri del paziente, tra cui l'età, la condizione fisiologica, le dimensioni e il peso, dalla durata del trattamento, dal tipo di terapia associata (se presente), dalla via specifica di somministrazione e da fattori simili. Di conseguenza, le dosi somministrate degli agenti qui descritti possono dipendere da vari di tali parametri. Nel caso in cui una reazione in un paziente sia insufficiente con una dose iniziale, possono essere impiegate dosi più elevate

(o dosi effettivamente superiori ottenute attraverso una differente via di somministrazione più localizzata).

Gli agenti e le composizioni qui descritti possono essere somministrati a pazienti, ad esempio in vivo, per trattare o prevenire una serie di disturbi come quelli qui descritti. Pazienti preferiti includono pazienti umani che presentano disturbi che possono essere corretti o migliorati somministrando gli agenti e le composizioni qui descritti. Ciò include disturbi che coinvolgono cellule caratterizzate da un pattern di espressione alterato di CLDN18.2. Per esempio, in una forma di realizzazione, gli anticorpi qui descritti possono essere utilizzati per trattare un paziente affetto da una malattia cancerosa, p.es. una malattia cancerosa come qui descritta, caratterizzata dalla presenza di cellule cancerose esprimenti CLDN18.2.

Le composizioni farmaceutiche e i metodi di trattamento descritti secondo l'insegnamento possono essere utilizzati anche per l'immunizzazione o la vaccinazione per prevenire una malattia descritta in questo documento.

Il presente insegnamento è ulteriormente illustrato dai seguenti esempi:

#### ESEMPI

Esempio 1: L'espressione di CLDN18.2 in linee cellulari umane di cancro gastrico viene stabilizzata dal trattamento *in vitro* con agenti chemioterapici

Cellule KatoIII, una linea cellulare tumorale gastrica umana, sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Invitrogen) contenente 20% FCS (Perbio) e 2mM Glutamax (Invitrogen) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, con o senza composti citostatici. L'epirubicina (Pfizer) è stata testata ad una concentrazione di 10 o 100 ng/ml, 5-FU (Neofluor di NeoCorp AG) è stato testato ad una concentrazione di 10 o 100 ng/ml e oxaliplatino (Hospira) è stato testato ad una concentrazione di 50 o 500 ng/ml. È stata inoltre utilizzata una combinazione di tutti e 3 i composti (EOF; epirubicina 10 ng/ml, oxaliplatino 500 ng/ml, 5-FU 10 ng/ml). 8x10<sup>5</sup> cellule KatoIII sono state coltivate per 96 ore senza cambio di terreno o per 72 ore seguite da 24 ore di coltura in terreno standard per rilasciare le cellule dall'arresto del ciclo cellulare in una piastra di coltura tissutale da 6 pozzetti a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state raccolte con EDTA/tripsina, lavate ed analizzate.

Per la rivelazione extracellulare di CLDN18.2, le cellule sono state colorate con l'anticorpo monoclonale anti-CLDN18.2 IMAB362 (Ganymed) o con un anticorpo di controllo di isotipo corrispondente (Ganymed). Come reagente secondario è stato utilizzato capra-anti-huIgG-APC di Dianova.

Le fasi del ciclo cellulare sono state determinate in base alla misurazione del contenuto di DNA cellulare. Ciò consente di discriminare tra le cellule nella fase G1, S o G2 del ciclo cellulare. Nella fase S ha luogo la duplicazione del DNA mentre nella fase G2 le cellule crescono e si preparano alla mitosi. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata utilizzando il "CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit" di BD Biosciences secondo il protocollo del produttore. L'acquisizione e l'analisi della citometria a flusso sono state effettuate utilizzando BD FACS CantoII (BD Biosciences) e il software FlowJo (Tree Star).

Le colonne in Figura 1a e b mostrano la rispettiva percentuale di cellule nella fase G1, S o G2 del ciclo cellulare. Le cellule KatoIII coltivate in terreno mostrano un arresto del ciclo cellulare prevalentemente nella fase G1. Cellule trattate con 5-FU vengono bloccate prevalentemente nella fase S. Cellule KatoIII trattate con epirubicina o EOF mostrano un arresto del ciclo cellulare prevalentemente nella fase G2. Cellule KatoIII trattate con oxaliplatino mostrano un arricchimento delle cellule prevalentemente nelle fasi G1 e G2. Come si può vedere in Figura 1c, un arresto del ciclo cellulare nella fase S o nella fase G2 determina una stabilizzazione o una sovra-regolazione di CLDN18.2. Non appena le cellule vengono rilasciate da qualsiasi fase del ciclo cellulare (Figura 1b), l'espressione di CLDN18.2 sulla superficie cellulare delle cellule KatoIII viene sovra-regolata (Figura 1d).

Cellule NUGC-4 e KATO III sono state trattate con 5-FU + OX (10 ng/ml 5-FU e 500 ng/ml oxaliplatino), EOF (10 ng/ml epirubicina, 500 ng/ml oxaliplatino e 10 ng/ml 5-FU) o FLO (10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml acido folinico e 500 ng/ml oxaliplatino) per 96 ore. L'RNA delle cellule NUGC-4 e KATO III pretrattate mediante chemioterapia è stato isolato e convertito in cDNA. Il livello del trascritto di CLDN18.2 è stato analizzato mediante PCR quantitativa in tempo reale. I risultati sono mostrati in Figura 2a come espressione relativa rispetto al livello di trascrizione del gene "housekeeping" HPRT. La Figura 2b mostra un Western blot di CLDN18.2 e del controllo di caricamento actina di cellule NUGC-4 non trattate e trattate. L'intensità del segnale di luminescenza è mostrata in relazione all'actina in percentuale.

Il pretrattamento delle cellule NUGC-4 e KATO III con le chemioterapie EOF, FLO ed anche con la combinazione di 5-FU + OX comporta un aumento dei livelli di RNA e proteine di CLDN18.2 come mostrato dalla PCR quantitativa in tempo reale (Figura 2a) e dal Western blot (Figura 2b). E' stato analizzato il legame di IMAB362 su cellule cancerose gastriche NUGC-4 e KATO III trattate con EOF (10 ng/ml epirubicina, 500 ng/ml oxaliplatino e 10 ng/ml 5-FU) o FLO (10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml acido folinico e 500 ng/ml oxaliplatino) per 96 ore mediante citometria a flusso. La quantità di proteina CLDN18.2 bersagliabile da parte di IMAB362 sulla superficie delle linee cellulari del cancro gastrico è aumentata come mostrato nella Figura 2c. Questo effetto era maggiormente preminente nelle cellule pretrattate con EOF o FLO.

Cellule KatoIII sono state pretrattate per 4 giorni con Irinotecano o Docetaxel ed analizzate per l'espressione di CLDN18.2 e per l'arresto del ciclo cellulare. Il trattamento delle cellule con Irinotecano ha determinato un'inibizione dose-dipendente della crescita cellulare e un arresto del ciclo cellulare nella fase S/G2 (Figura 3). Il trattamento delle cellule con Docetaxel ha determinato un'inibizione dose-dipendente della crescita cellulare e un arresto del ciclo cellulare nella fase G2 (Figura 3).

Esempio 2: Il pretrattamento di cellule di cancro gastrico umano con agenti chemioterapici determina una maggiore efficienza della ADCC mediata da IMAB362

L'ADCC mediata da IMAB362 è stata studiata utilizzando cellule di cancro gastrico NUGC-4 come bersaglio, che sono state pretrattate o con 10 ng/ml 5-FU e 500 ng/ml oxaliplatino (5-FU + OX), o con 10 ng/ml epirubicina, 500 ng/ml oxaliplatino e 10 ng/ml 5-FU (EOF) o con 10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml acido folinico e 500 ng/ml oxaliplatino (FLO) per 96 ore (rapporto effetto:bersaglio 40:1) o che non sono state trattate. Sono stati ottenuti i valori  $EC_{50}$  da 7 donatori sani per le cellule NUGC-4 non trattate e pretrattate con EOF, FLO o 5-FU + OX.

Come mostrato in Figura 4a, le curve di dose/risposta sulle cellule pretrattate si sono spostate verso l'alto e verso sinistra rispetto alle cellule bersaglio non trattate. Ciò ha determinato una lisi massima più elevata e una diminuzione dei valori  $EC_{50}$  fino a un terzo delle cellule non trattate (Figura 4b). Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), tra cui cellule NK, monociti, cellule mononucleate o altre cellule effettrici provenienti da donatori umani sani sono state purificate mediante centrifugazione di densità in Ficoll Hypaque. Le cellule effettrici lavate sono state seminate in terreno X-Vivo. Cellule KatoIII che esprimono CLDN18.2 in maniera endogena e sono di origine gastrica sono state utilizzate come cellule bersaglio in questo allestimento. Le cellule bersaglio esprimevano stabilmente la luciferasi, giallo luciferino, che viene ossidato solo dalle cellule vive. È stato aggiunto l'anticorpo anti-CLDN18.2 purificato IMAB362 a diverse concentrazioni e, come anticorpo di controllo di isotipo corrispondente, è stato utilizzato un anticorpo chimerico irrilevante huIgG1. I campioni sono stati analizzati per la citolisi misurando la luminescenza derivante dall'ossidazione del giallo luciferino che è un valore per la quantità delle cellule vive rimanenti dopo la citotossicità indotta da IMAB362. KatoIII pretrattate per 3 giorni con Irinotecano (1000 ng/ml), Docetaxel (5 ng/ml) o Cisplatino (2000 ng/ml) sono state confrontate con le cellule bersaglio coltivate in terreno non trattato ed è stata quantificata l'ADCC indotta da IMAB362.

Cellule KatoIII pretrattate per 3 giorni con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino mostravano un livello più basso di cellule vive rispetto a cellule bersaglio coltivate in terreno (Figura 5a) e l'espressione di claudina18.2 in cellule pretrattate con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino era aumentata rispetto che in cellule coltivate in terreno (Figura 5b).

Inoltre, il pretrattamento delle cellule KatoIII con Irinotecano, Docetaxel o Cisplatino aumentava la potenza di IMAB362 nell'indurre la ADCC (Figura 5c, d).

### Esempio 3: La chemioterapia determina una maggiore efficienza della CDC indotta da IMAB362

Gli effetti di agenti chemioterapici sulla CDC indotta da IMAB362 sono stati analizzati pretrattando cellule di cancro gastrico KATO III con 10 ng/ml 5-FU e 500 ng/ml oxaliplatino (5-FU + OX) per 48 ore. In Figura 6 sono mostrate curve di dose-risposta rappresentative della CDC indotta da IMAB362 con utilizzo di cellule KATO III pretrattate con agenti chemioterapici. Il pretrattamento di cellule tumorali per 48 ore aumentava la potenza di IMAB362 nell'indurre la CDC, dando luogo ad una lisi cellulare massima più elevata di cellule tumorali pretrattate rispetto a cellule non trattate.

Esempio 4: La capacità delle cellule immunitarie effettrici di compiere la ADCC mediata da IMAB362 non è compromessa dal trattamento con agenti chemioterapici

Gli agenti chemioterapici utilizzati nel regime EOF o FLO sono altamente potenti nell'inibizione della proliferazione delle cellule bersaglio. Per studiare gli effetti avversi della chemioterapia sulle cellule effettrici, PBMC provenienti da donatori sani sono state trattate con 10 ng/ml epirubicina, 500 ng/ml oxaliplatino e 10 ng/ml 5-FU (EOF) o con 10 ng/ml 5-FU, 50 ng/ml acido folinico e 500 ng/ml oxaliplatino (FLO) per 72 ore prima dell'applicazione in saggi per la ADCC. La Figura 7a mostra valori  $EC_{50}$  di 4 donatori sani e la Figura 7b mostra curve di dose/risposta rappresentative della ADCC indotta da IMAB362 con utilizzo di cellule effettrici pretrattate con EOF o FLO. La ADCC IMAB362-indotta di cellule di carcinoma gastrico NUGC-4 non viene compromessa dalle chemioterapie EOF o FLO.

Esempio 5: Una combinazione di trattamento con ZA/IL-2 determina un'espansione ottimizzata di colture di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC)

L'effetto di ZA/IL-2 sulla proliferazione di colture di PBMC è stato valutato *in vitro*. Sono state prelevate PBMC da donatori umani sani e le colture sono state trattate con una singola dose di ZA. Ogni 3-4 giorni è stata aggiunta IL-2. In particolare, PBMC derivate da 3 diversi donatori umani sani (#1, #2, #3) sono state coltivate in terreno RPMI ( $1 \times 10^6$  cellule/ml) per 14 giorni con  $1 \mu\text{M}$  ZA più dosi alte (300 U/ml) o basse (25 U/ml) di IL-2; cfr. la Figura 8a. PBMC degli stessi donatori sono state coltivate inoltre in terreno RPMI per 14 giorni con 300 U/ml IL-2 più ZA o senza ZA; cfr. la Figura 8b. L'aumento dei numeri di cellule è stato determinato contando le cellule vive i giorni 6, 8, 11 e 14.

In terreno in cui è stata aggiunta un'alta dose di IL-2, si è espanso un numero di cellule circa 2 - 5 volte più elevato, rispetto a colture munite di una dose bassa di IL-2 (Figura 8a). L'espansione delle cellule in terreno senza ZA era circa 2 volte più bassa rispetto a cellule coltivate in terreno con ZA (Figura 8b). Questi dati mostrano la necessità di applicare entrambi i composti ZA e IL-2 in combinazione per garantire un'espansione appropriata delle cellule.

Esempio 6: Il trattamento con ZA/IL-2 causa un'espansione di quantità elevate di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  in colture di PBMC

Le PBMC sono state coltivate per 14 giorni in terreno RPMI integrato con 300 U/ml IL-2 e con o senza  $1 \mu\text{M}$  ZA. La percentuale di cellule T  $V\gamma 9+V\delta 2+$  nella popolazione di linfociti  $CD3+$  (Figura 9a) e la percentuale di cellule  $CD16+$  nella popolazione di cellule T  $CD3+V\gamma 9+V\delta 2+$  (Figura 9b) è stata determinata tramite FACS multicolore il giorno 0 e il giorno 14. I risultati sono stati segnati per ciascun donatore nel grafico di dispersione. La Figura 9c mostra un grafico di dispersione in cui si può osservare l'aumento nel tempo (arricchimento) del numero di cellule T  $CD3+V\gamma 9+V\delta 2+$  e  $CD3+CD16+V\gamma 9+V\delta 2+$  nella popolazione linfocitaria. Sono state tenute in conto la quantità di cellule seminate il giorno 0 e la quantità di cellule



raccolte il giorno 14.

L'aggiunta di IL-2 nelle colture di PBMC è necessaria per la sopravvivenza e la crescita dei linfociti. Esse si espandono in modo efficiente in colture a cui vengono fornite 300 U/ml IL-2. L'analisi al FACS con utilizzo di anticorpi specifici per  $V\gamma 9$  e  $V\delta 2$  rivela che l'aggiunta di ZA/IL-2 induce in modo specifico un accumulo di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  (Figura 9a). Dopo 14 giorni, la popolazione di linfociti CD3+ può comprendere fino all'80% di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$ . Una parte di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  esprime CD16, mentre l'arricchimento di queste cellule nella popolazione linfocitaria CD3+ è di 10-700 volte, a seconda del donatore (Figure 9b e 9c). L'arricchimento delle cellule T CD16+ $V\gamma 9$ + $V\delta 2$  nelle colture è 10-600 volte più alto rispetto a colture coltivate senza ZA (Figura 9c). Concludiamo che il trattamento delle PBMC con ZA/IL-2 *in vitro* causa una sovra-regolazione del recettore di Fc $\gamma$ III CD16 che media la ADCC in una proporzione significativa di cellule T  $\gamma\delta$ .

#### Esempio 7: IL-2 influenza l'espansione delle cellule T $V\gamma 9V\delta 2$ in maniera dose-dipendente

L'aggiunta di ZA nelle colture è il fattore più importante per indurre lo sviluppo di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$ . È ben noto che IL-2 è necessaria per la crescita e la sopravvivenza delle cellule T.

Le PBMC sono state coltivate per 14 giorni in terreno RPMI integrato con 1  $\mu$ M ZA e concentrazioni crescenti di IL-2. IL-2 è stata aggiunta il giorno 0 e il giorno 4. L'arricchimento delle cellule T CD16+ $V\gamma 9$ + $V\delta 2$  nella popolazione di linfociti CD3+ è stato determinato tramite colorazione FACS multicolore il giorno 0 e il giorno 14. Per confrontare i differenti donatori, la quantità di cellule T CD16+ $V\gamma 9$ + $V\delta 2$  raccolte in seguito a coltivazione con 600 U/ml IL-2 è stata fissata al 100%; cfr. la Figura 10, a sinistra. Inoltre, è stata testata l'attività ADCC delle colture isolate coltivate per 14 giorni in concentrazioni crescenti di IL-2; cfr. la Figura 10, a destra.

Tramite analisi della dose-risposta abbiamo confermato che anche IL-2 stimola la crescita e la sopravvivenza del sottogruppo di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$ . Tramite aggiunta di concentrazioni basse di IL-2 nel terreno, è stata osservata una correlazione tra la dose di IL-2 e la percentuale di cellule T CD16+ $V\gamma 9V\delta 2$  nella popolazione di linfociti CD3+ (Figura 10, a sinistra). L'attività ADCC delle cellule coltivate in concentrazioni più alte di IL-2 (150-600U/ml) è migliorata rispetto a cellule coltivate in concentrazioni basse di IL-2 (Figura 10, a destra).

#### Esempio 8: ZA induce produzione di IPP in monociti e cellule cancerose stimolanti entrambi l'espansione di cellule T $V\gamma 9V\delta 2$

PBMC fresche (Esp. #1) o colture di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  stimolate con ZA/IL-2 per 14 giorni (Esp. #2-5) sono state incubate senza monociti (rapporto effettore:monocita 1:0), oppure con 0,2 volte (4:1) o 5 volte (rapporto 1:4) la quantità di monociti  $\pm$  1  $\mu$ M ZA. L'arricchimento delle cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  nelle co-culture dopo 14 giorni è stato determinato tramite FACS multicolore, mentre nel calcolo è stata considerata l'espansione della coltura. Il fattore di arricchimento di cellule T  $V\gamma 9V\delta 2$  coltivate con monociti ad un rapporto di 1:4 è stato fissato al 100% per ciascun esperimento. L'aumento

dei monociti nella coltura ha determinato un arricchimento delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 di più di 10 volte. Questo effetto era chiaramente ZA-dipendente; cfr. la Figura 11a.

Inoltre, cellule di cancro dello stomaco umane (NUGC-4-luciferasi) e cellule di cancro dello stomaco murine (CLS103 - colorate con calceina) sono state pretrattate con o senza 5  $\mu$ M ZA per 2 giorni. Cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 umane sono state purificate tramite MACS (giorno 14) e co-coltivate con le cellule cancerose per 24 h. La citotossicità delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 verso cellule bersaglio non trattate e trattate con ZA è stata determinata misurando l'attività della luciferasi rimanente o la fluorescenza della calceina; cfr. la Figura 11b. Le cellule bersaglio (NUGC-4 e CLS103) sono state pretrattate con o senza 5  $\mu$ M ZA per 2 giorni e successivamente incubate per 4 h con mitomicina c (50 MI) per arrestare la proliferazione. Alle cellule bersaglio sono stati aggiunti cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 quiescenti umane di 14g, purificate tramite MACS, e  $^3$ H-timidina, e le co-culture sono state incubate per 48 h a 37°C. La proliferazione è stata determinata misurando l'incorporazione di  $^3$ H timidina nel DNA utilizzando un contatore a scintillazione MicroBeta. La proliferazione di cellule bersaglio non trattate con ZA e senza cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 è stata fissata al 100%; cfr. la Figura 11c.

Come mostrato nelle Figure 11b e 11c, le cellule cancerose umane pulsate con ZA hanno attivato le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 in termini di citotossicità (5-10 volte) e di proliferazione (1,4-1,8 volte), mentre la linea di cellule cancerose murine CLS103 non è riuscita a indurre questi effetti sulle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.

#### Esempio 9: Il trattamento con ZA/IL-2 influisce sulla composizione delle colture di PBMC

La crescita e la differenziazione di specifici tipi di cellule nelle colture di PBMC dipendono dalla presenza di citochine. Questi componenti vengono aggiunti al terreno (p.es. fattori di crescita presenti nel siero, IL-2) o secreti dalle cellule immunitarie stesse. Anche il tipo di cellule che si evolve dipende dalla composizione iniziale delle PBMC e dalle dotazioni genetiche. Per analizzare l'aumento complessivo delle cellule effettrici (cellule NK e cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2), PBMC di 10 donatori diversi sono state coltivate in presenza di 300 U/ml di IL-2 e con o senza 1  $\mu$ M ZA per 14 giorni. La quantità di cellule effettrici nella popolazione linfocitaria è stata identificata mediante colorazione FACS multicolore utilizzando anticorpi per CD3, CD16, CD56, V $\gamma$ 9 e V $\delta$ 2. Le cellule CD3-CD56+CD16+ rappresentano cellule NK e le cellule CD3+V $\gamma$ 9+V $\delta$ 2+ rappresentano cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. L'analisi FACS multicolore ha rivelato che in seguito a trattamento con IL-2 si sviluppano soprattutto le cellule NK, mentre in colture trattate con ZA/IL-2 si espandono prevalentemente le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Figura 12).

#### Esempio 10: Il trattamento con ZA/IL-2 genera cellule T effettrici della memoria V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+

Le sottopopolazioni dei linfociti T possono essere delineate con l'aiuto di due marcatori di superficie, l'isoforma ad alto peso molecolare dell'antigene linfocitario comune CD45RA e il recettore delle chemochine CCR7. Le cellule T CCR7+ native e della memoria centrale (CM) sono caratterizzate

dalla capacità di circolare ripetutamente nei linfonodi e incontrare l'antigene. Al contrario, i linfociti T effettori della memoria (EM) ed effettori RA+ (TEMRA) sotto-regolano CCR7 e appaiono specializzati nella migrazione a tessuti non linfoidi periferici, p.es. a siti infetti o tumorali. Le cellule EM possono essere ulteriormente suddivise in base all'espressione differenziale di CD27 e CD28. La perdita progressiva dell'espressione in superficie di CD28 e CD27 è concomitante con una sovra-regolazione della capacità citolitica delle cellule. Inoltre, il livello di CD57 è correlato all'espressione dei granzimi e delle perforine e rappresenta quindi un terzo marcatore che mostra citotossicità/maturazione cellulare.

PBMC sono state coltivate con o senza 1  $\mu$ M ZA e 300 U/ml IL-2 per 14 giorni. L'espressione dei differenti marcatori di superficie è stata determinata tramite analisi FACS multicolore il giorno 0 (PBMC) e il giorno 14. Le cellule native sono CD45RA+ CCR7+, le cellule della memoria centrale (CM) sono CD45RA- CCR7+, TEMRA sono CD45RA+ CCR7- e le cellule effetttrici della memoria (EM) sono negative per entrambi i marcatori; cfr. la Figura 13a. Inoltre, l'attività citolitica delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 è stata determinata mediante colorazione per i marcatori CD27 e CD57; cfr. la Figura 13b, c. Inoltre, lo sviluppo di caratteristiche di tipo cellula NK importanti per l'attività ADCC è stato analizzato colorando le cellule CD3+ con CD16 (legame all'anticorpo) e CD56 (adesione); cfr. la Figura 13d.

L'analisi FACS multicolore delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 ha rivelato che il trattamento con ZA/IL-2 ha chiaramente stimolato lo sviluppo di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 del tipo EM che sono CD27- e CD57+ (Figura 13b-c). Oltre all'aumento dell'attività citolitica, nella popolazione CD3+ è stato osservato un aumento del livello di CD16 e CD56, che dalle cellule NK (CD3-CD16+CD56+) sono noti essere implicati nella ADCC (Figura 13d).

Considerati insieme, questi dati implicano che il trattamento con ZA delle PBMC determina lo sviluppo di cellule T effetttrici della memoria CD16+V $\gamma$ 9+V $\delta$ 2+, che sono in grado di migrare verso tessuti non linfoidi periferici e mostrano marcatori ad alta attività citolitica. In combinazione con l'anticorpo IMAB362 indirizzato ai tumori, queste cellule sono estremamente ben bardate per migrare verso, bersagliare ed uccidere le cellule tumorali.

Esempio 11: Cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 espanse tramite ZA/IL-2 sono degli effettori potenti per la ADCC CLDN18.2-dipendente mediata da IMAB362

Analogamente alle cellule NK, le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 espanse tramite ZA/IL-2 sono positive per CD16 (si vedano le Figure 9 e 13), il recettore di Fc $\gamma$ RIII attraverso il quale un anticorpo legato alla cellula innesca la ADCC. Per valutare se le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 siano in grado di indurre una ADCC potente in combinazione con IMAB362, sono state eseguite una serie di esperimenti.

PBMC derivanti da 2 donatori differenti (#1 e #2) sono state coltivate in terreno con 300 U/ml IL-2 e con o senza 1  $\mu$ M ZA. Dopo 14 giorni, le cellule sono state raccolte e aggiunte con concentrazioni crescenti (0,26 ng/ml - 200  $\mu$ g/ml) di IMAB362 a cellule NUGC-4 che esprimono CLDN18.2. L'uccisione specifica è stata determinata in saggi di luciferasi; cfr. la Figura 14a. La Figura 14b,c fornisce una panoramica di saggi ADCC eseguiti

con 27 donatori coltivati in 300 U/ml IL-2 e con o senza ZA. NUGC-4 ha rappresentato le cellule bersaglio. Per ciascun donatore, i valori  $EC_{50}$  (b) calcolati dalle curve di dose-risposta e la velocità massima di uccisione specifica ad una dose di 200  $\mu\text{g/ml}$  IMAB362 (c) sono stati riportati nei diagrammi di dispersione.

Utilizzando PBMC coltivate per 14 giorni con ZA/IL-2 è stata osservata una forte attività ADCC IMAB362-dipendente contro cellule NUGC-4 CLDN18.2-positivie (Figura 14a). Utilizzando colture di PBMC trattate con ZA/IL-2, la ADCC dipende dalla presenza di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (Figure 12 e 15). Se le cellule vengono coltivate senza ZA, l'attività ADCC viene ridotta per la maggior parte dei donatori. In queste colture, l'attività ADCC residua è dipendente dalle cellule NK (Figure 11 e 14). Esaminando più di 20 donatori, i saggi ADCC rivelano che il trattamento con ZA/IL-2 delle PBMC migliora l' $EC_{50}$  e le velocità massime di uccisione specifica rispetto a PBMC coltivate solo con IL-2.

Inoltre, PBMC di due diversi donatori (#1 + #2) sono state coltivate con 1  $\mu\text{M}$  ZA e 300 U/ml IL-2. Queste colture di cellule effettrici sono state utilizzate in saggi ADCC con linee cellulari bersaglio umane CLDN18.2-positivie (NUGC-4, KATO III) e negativie (SK-BR-3) (rapporto E:T 40:1). Sono state aggiunte quantità crescenti (0,26 ng/ml - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) di anticorpo IMAB362. L'ADCC è stata misurata in saggi di luciferasi; cfr. la Figura 15a. Lo stesso esperimento descritto in (a) è stato eseguito con cellule bersaglio NUGC-4 e cellule effettrici raccolte da colture trattate con ZA/IL-2 in momenti diversi; cfr. la Figura 15b. Lo stesso esperimento descritto in (a) è stato eseguito utilizzando NUGC-4 come cellule bersaglio; cfr. la Figura 15c. Le cellule espanse mediante ZA/IL-2 sono state utilizzate direttamente oppure le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sono state purificate dalle colture utilizzando la selezione di TCR $\gamma\delta$  tramite MACS (Miltenyi Biotech). È stata ottenuta una purezza di oltre il 97,0% di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 nei linfociti. È stata osservata una forte attività ADCC contro linee cellulari tumorali umane CLDN18.2-positivie, ma non CLDN18.2-negativie (Figura 15a). Inoltre, non viene ottenuta alcuna attività ADCC con anticorpi di controllo di isotipo corrispondente (non mostrato). Nel corso del trattamento con ZA/IL-2, l'attività litica ADCC aumenta nel tempo per una frazione di donatori (Figura 15b). La curva di dose/effetto di IMAB362 si sposta verso l'alto e verso sinistra mostrando valori  $EC_{50}$  migliorati e velocità massime di lisi nel tempo. Rispetto a PBMC non condizionate, le cellule T effettrici V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 arricchite mediante il trattamento con ZA/IL-2 sono in grado di raggiungere un tasso di uccisione massimo superiore delle cellule bersaglio CLDN18.2-positivie e in più richiedono minori concentrazioni di IMAB362 per lo stesso tasso di uccisione.

Per confermare che le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 siano il serbatoio per l'attività litica, queste cellule sono state isolate con una purezza >97% mediante selezione cellulare magnetica da popolazioni PBMC coltivate con ZA/IL-2 il giorno 14. L'attività ADCC in combinazione con IMAB362 viene mantenuta e parzialmente migliorata grazie alla maggiore purezza. Questi dati confermano che le cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sono principalmente responsabili dell'attività ADCC osservata con colture di PBMC di 14 giorni (Figura 15c).

Esempio 12: Il trattamento di linee cellulari bersaglio con ZA/IL-2 non influisce sull'espressione in superficie di CLDN18.2

Le modalità di azione innescate da IMAB362 sono strettamente dipendenti dalla presenza e dalla quantità di CLDN18.2 extracellulare che può essere rivelata. Pertanto, l'influenza del trattamento con ZA/IL-2 sulla densità di superficie di CLDN18.2 è stata analizzata mediante citometria a flusso utilizzando le linee cellulari NUGC-4 e KATO III esprimenti CLDN18.2 endogeno. In particolare, è stata eseguita un'analisi citometrica a flusso del legame di IMAB362 su cellule cancerose gastriche NUGC-4 non permeabilizzate, pretrattate con ZA/IL-2 o ZA/IL-2 + EOF o ZA/IL-2 + 5-FU/OX per 72 ore.

Il trattamento con ZA/IL-2 *in vitro* non rivela alcuna variazione nella quantità di localizzazione in superficie di CLDN18.2; cfr. la Figura 16.

Esempio 13: L'aumento della ADCC IMAB362-mediata per mezzo di trattamento con ZA/IL-2 delle PBMC non viene compromesso dal pretrattamento con EOF

Gli agenti chemioterapici compromettono la proliferazione cellulare. Al contrario, il trattamento con ZA/IL-2 innesca l'espansione delle cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Per analizzare le influenze di queste interazioni opposte sulle cellule effettrici, PBMC di 6 donatori sani sono state coltivate con ZA/IL-2 o ZA/IL-2 + EOF per 8 giorni prima dell'applicazione in saggi ADCC (rapporto E:T 15:1). Sono state determinate le concentrazioni di IMAB362 che hanno determinato una lisi del 50% mediata da ADCC di cellule bersaglio NUGC-4 non trattate (EC<sub>50</sub>).

L'aumento della ADCC IMAB362-indotta delle cellule NUGC-4 causato dal trattamento delle PBMC con ZA/IL-2 non è significativamente alterato dal trattamento combinato delle PBMC con EOF (Figura 17).

Esempio 14: Indirizzamento *in vivo* di IMAB362 verso tumori CLDN18.2-positivi ed effetti antitumorali di IMAB362 su xeno-trapianti di cellule tumorali umane in topi nudi

Per studiare l'indirizzamento di IMAB362 alle cellule tumorali *in vivo*, 80 $\mu$ g di anticorpo marcato con Dyelight® 680 sono stati somministrati per via endovenosa a topi nudi che sono stati sottoposti a xeno-trapianto cutaneo con la linea cellulare NUGC-4 di cancro gastrico umano. Le cellule NUGC-4 mostrano un'espressione in superficie di CLDN18.2 così come di HER2/neu (bersaglio di trastuzumab), ma sono negative per CD20. Sono stati condotti studi di controllo iniettando trastuzumab marcato con Dyelight 680 (gruppo di controllo positivo) o rituximab marcato con Dyelight® 680 (controllo negativo) in gruppi di topi sottoposti a innesto con NUGC-4. IMAB362 si accumula fortemente ed esclusivamente negli xeno-trapianti tumorali, come dimostrato dall'imaging live di topi utilizzando un sistema di imaging a fluorescenza Xenogen® 24 ore dopo iniezione i.v. di anticorpi (Figura 18). IMAB362 viene mantenuto efficacemente nel tumore bersaglio-positivo ed è rivelabile con un'intensità paragonabile anche dopo 120 ore (Figura 18). Anche trastuzumab viene rivelato esclusivamente negli xeno-trapianti 24 ore dopo l'iniezione. Il segnale di trastuzumab viene

rapidamente lavato via entro 120 ore dall'iniezione. Non viene rivelato alcun segnale con rituximab.

Inoltre, IMAB362 è stato usato per il trattamento di topi nudi portanti tumori xeno-trapiantati CLDN18.2-positivi. Sono stati condotti studi di modelli di trattamento precoce (con somministrazioni di IMAB362 già 3 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali). Inoltre, sono stati avviati esperimenti di trattamento avanzato del tumore fino a 9 giorni dopo l'inoculo delle cellule tumorali quando i tumori avevano raggiunto volumi di circa 60-120 mm<sup>3</sup>.

Nei topi nudi sono stati inoculati per via sottocutanea  $1 \times 10^7$  trasfettanti HEK293-CLDN18.2. Il trattamento di 10 topi per gruppo è iniziato 3 giorni dopo l'inoculo tumorale. I topi sono stati trattati con 200 µg IMAB362, infliximab come controllo di isotipo e PBS due volte alla settimana per 6 settimane, alternando vie di applicazione endovenose ed intraperitoneali. Mentre tutti i topi nei gruppi trattati con PBS o con il controllo di isotipo sono morti entro 70-80 giorni, gli animali trattati con IMAB362 hanno avuto un vantaggio di sopravvivenza (Figura 19). Non solo è stato prolungato il tempo fino alla morte, ma 4 su 10 topi sono sopravvissuti per l'intero periodo di osservazione di 210 giorni.

Il trattamento di 9 a 10 topi per gruppo è stato iniziato quando i volumi tumorali medi hanno raggiunto 88 mm<sup>3</sup> (62 - 126 mm<sup>3</sup>). Prima del trattamento, i topi sono stati stratificati in gruppi di test per garantire la comparabilità delle dimensioni dei tumori in tutti i gruppi. I topi sono stati trattati con 200 µg di IMAB362, controllo di isotipo o PBS due volte alla settimana per 6 settimane, alternando vie di applicazione endovenose ed intraperitoneali. Tutti i topi nei gruppi trattati con PBS o con il controllo di isotipo sono morti entro 50-100 giorni. Gli animali trattati con IMAB362 hanno avuto un beneficio di sopravvivenza, con quasi il raddoppio del tempo di sopravvivenza medio (47 versus 25 giorni). Tre di questi topi sono sopravvissuti per l'intero periodo di osservazione (Figura 20). È importante notare che l'efficacia antitumorale *in vivo* dipende dalla presenza del bersaglio sulle cellule tumorali. Nei topi sottoposti a innesto con cellule tumorali HEK293 CLDN18.2-negative non è stato osservato alcun effetto antitumorale del trattamento con IMAB362.

Il modello tumorale gastrico NUGC-4 è stato utilizzato per studiare l'efficacia di IMAB362 contro cellule cancerose con espressione endogena di CLDN18.2. Le cellule NUGC-4 crescono in maniera aggressiva nei topi nudi.

$1 \times 10^7$  cellule cancerose gastriche NUGC-4 sono state iniettate per via sottocutanea nel fianco sinistro di topi nudi atimici (n = 9 per il gruppo IMAB362, n = 8 per i gruppi di controllo). IMAB362 (200 µg per iniezione) ed i controlli sono stati applicati due volte alla settimana, alternando i.v. e i.p., a partire da 6 giorni dopo l'inoculo tumorale con iniezione i.v. Le dimensioni tumorali sono state monitorate due volte alla settimana. I dati presentati in Figura 21a sono medie con SEM. La crescita tumorale in topi trattati con IMAB362 è stata inibita significativamente rispetto a topi trattati con controlli (\* p < 0,05). La Figura 21b mostra i volumi tumorali il giorno 21 dopo l'inoculo tumorale. I volumi dei tumori nei topi trattati

con IMAB362 erano significativamente inferiori rispetto ai tumori dei topi di controllo (\*  $p < 0,05$ ).

Quando nei topi vengono inoculate  $1 \times 10^7$  cellule tumorali, il tempo medio di sopravvivenza dei topi non trattati non è superiore a 25 giorni. Il trattamento con IMAB362, cetuximab, trastuzumab o controlli di isotipo e tampone è stato avviato quando i volumi tumorali hanno raggiunto dimensioni medie di circa  $109 \text{ mm}^3$  ( $63\text{-}135 \text{ mm}^3$ ). I topi sono stati stratificati a seconda delle dimensioni in gruppi di trattamento (Figura 21). È stato dimostrato che IMAB362 riduce significativamente la velocità di crescita del tumore. Non è stata osservata alcuna riduzione significativa della crescita tumorale rispetto a controlli salini o anticorpali per questo modello tumorale a crescita aggressiva. Il ritardo nella crescita del tumore era associato ad un tempo di sopravvivenza medio non significativamente aumentato dei topi trattati con IMAB362 (31 giorni rispetto a 25 giorni).

L'attività antitumorale di IMAB362 è stata esaminata con due modelli di xeno-trapianto di carcinoma gastrico umano utilizzando cellule NCI-N87 o NUGC-4 con trasduzione lentivirale di IMAB362 indirizzato a CLDN18.2 (NCI-N87~CLDN18.2 e NUGC-4~CLDN18.2).

Tumori di xeno-trapianto NCI-N87~CLDN18.2 sono stati inoculati per via sottocutanea mediante iniezione di  $1 \times 10^7$  cellule NCI-N87~CLDN18.2 nel fianco di 8 topi nudi (femmine, 6 settimane) per gruppo di trattamento. Il trattamento è iniziato 5 giorni dopo l'inoculo del tumore mediante iniezione endovenosa di  $800 \mu\text{g}$  di IMAB362 o con  $200 \mu\text{l}$  di  $0,9\%$  NaCl per il gruppo di controllo salino. La somministrazione endovenosa è stata continuata settimanalmente per l'intero periodo di osservazione. Le dimensioni tumorali e la salute degli animali sono state monitorate semi-settimanalmente. La Figura 22a mostra gli effetti del trattamento con IMAB362 sulla crescita tumorale. Le dimensioni dei tumori s.c. sono state misurate due volte alla settimana (media + SEM, \*\*\*  $p < 0,001$ ). La Figura 22b mostra diagrammi di sopravvivenza di Kaplan-Meier. I topi venivano sacrificati quando il tumore raggiungeva un volume di  $1400 \text{ mm}^3$ .

Pertanto, il trattamento continuo con IMAB362 ha inibito in maniera altamente significativa ( $p < 0,001$ ) la crescita tumorale degli xeno-trapianti del carcinoma gastrico NCI-N87~CLDN18.2 (Figura 22a). Il ritardo nella crescita del tumore era associato ad un tempo di sopravvivenza significativamente più lungo ( $p < 0,05$ ) dei topi trattati con IMAB362 (Figura 22b).

L'immunoterapia con IMAB362 degli xeno-trapianti NUGC-4~CLDN18.2 a crescita rapida ha portato a dimensioni tumorali significativamente inferiori ( $p < 0,05$ ) il giorno 14 del trattamento. Dopo le prime due settimane di trattamento con IMAB362, la progressione tumorale di NUGC-4~CLDN18.2 era molto aggressiva. Comunque, l'inibizione della crescita tumorale di NUGC-4~CLDN18.2 fino al giorno 14 del trattamento ha determinato una sopravvivenza significativamente più lunga ( $p < 0,05$ ) dei topi trattati con IMAB362.

In sintesi, IMAB362 era estremamente efficace nel trattamento di xeno-trapianti di carcinomi gastrici, mostrando un ritardo significativo della progressione tumorale e una sopravvivenza prolungata in modelli tumorali positivi per CLDN18.2 endogeno. In sistemi di modelli tumorali molto

aggressivi, questi effetti antitumorali di IMAB362 sono meno importanti, ma comunque significativi, sottolineando la forte capacità antitumorale di IMAB362.

Esempio 15: Effetti antitumorali di IMAB362 combinato con la chemioterapia in modelli di tumori di topo

*In vitro*, l'ADCC mediata da IMAB362 è più efficace su cellule cancerose gastriche umane pretrattate con combinazioni di agenti chemioterapici, tra cui EOF e 5-FU + OX. Pertanto, l'impatto antitumorale della combinazione di questi composti con IMAB362 è stato studiato *in vivo* in modelli tumorali di topo.

Tumori di xeno-trapianto NCI-N87~CLDN18.2 sono stati inoculati mediante iniezione di  $1 \times 10^7$  cellule NCI-N87~CLDN18.2 per via sottocutanea nel fianco di 9 topi per ogni gruppo di trattamento. Topi portanti i tumori sono stati trattati secondo il regime EOF con 1,25 mg/kg epirubicina, 3,25 mg/kg oxaliplatino e 56,25 mg/kg 5-fluorouracile per via intraperitoneale i giorni 4, 11, 18 e 25 dopo l'inoculo tumorale, seguito da iniezione endovenosa di 800 µg di IMAB362 24 ore dopo la somministrazione della chemioterapia. Il trattamento con IMAB362 è stato continuato settimanalmente. Le dimensioni tumorali e la salute degli animali sono state monitorate semi-settimanalmente. La Figura 23a mostra gli effetti del trattamento combinato sulla crescita tumorale.

Le dimensioni dei tumori s.c. sono state misurate due volte alla settimana (media + SEM, \* p <0,05). La Figura 23b mostra diagrammi di sopravvivenza di Kaplan-Meier. I topi venivano sacrificati quando il tumore raggiungeva un volume di 1400 mm<sup>3</sup>.

I topi nudi portanti i tumori NCI-N87~CLDN18.2 trattati con IMAB362 o con il regime EOF mostravano una crescita tumorale soppressa in maniera altamente significativa rispetto ai topi di controllo. Il trattamento addizionale di IMAB362 in combinazione con la chemioterapia EOF ha determinato un'inibizione della crescita tumorale significativamente più elevata (p <0,05) rispetto al trattamento con il solo regime EOF (Figura 23a). La sopravvivenza media dei topi del gruppo di controllo salino era di 59 giorni. Il trattamento settimanale dei topi con IMAB362 ha prolungato la sopravvivenza media in modo significativo fino a 76 giorni similmente alla sopravvivenza dei topi del gruppo EOF, anch'essi con una sopravvivenza media di 76 giorni. Ma il trattamento combinato con IMAB362 e EOF ha aumentato la sopravvivenza media fino a 81 giorni (Figura 23b).

Tumori di xeno-trapianto sono stati inoculati mediante iniezione di  $1 \times 10^7$  cellule NUGC-4~CLDN18.2 per via sottocutanea nel fianco di 10 topi nudi (femmine, sei settimane di età) per gruppo di trattamento. I topi sono stati trattati i giorni 3, 10, 17 e 24 con agenti chemioterapici. Il trattamento con IMAB362 è continuato settimanalmente. La Figura 24a mostra curve di crescita tumorale di xeno-trapianti s.c. di NUGC-4~CLDN18.2 (media + SEM). La Figura 24b mostra diagrammi di sopravvivenza di Kaplan-Meier (Test dei Ranghi Logaritmici (Mantel-Cox), \*\*p<0,01).

Tumori di xeno-trapianti sottocutanei di NUGC-4~CLDN18.2 crescono in maniera molto aggressiva. Ciononostante, il trattamento di topi nudi



portanti tumori con IMAB362 ha inibito significativamente la crescita tumorale rispetto al gruppo di controllo trattato con soluzione salina. Nella terapia combinata con EOF, gli effetti di IMAB362 sulla crescita tumorale di NUGC-4~CLDN18.2 erano mascherati dall'inibizione della crescita dovuta al trattamento con EOF, non mostrando alcun aumento dell'inibizione della crescita tumorale rispetto al trattamento solo con EOF (Figura 24a). Comunque, la sopravvivenza media di topi trattati con IMAB362 e con il regime EOF è stata prolungata in maniera altamente significativa ( $p < 0,01$ ) rispetto alla sopravvivenza di topi trattati solo con EOF (Figura 24b).

Esempio 16: Cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 espanse mediante ZA/IL-2 migliorano il controllo IMAB362-mediato di tumori avanzati *in vivo*

Per studiare l'attività combinata di IMAB362 e di cellule T  $\gamma\delta$  generate mediante ZA/IL-2 in sistemi di topo, siamo ricorsi a topi NSG. I topi NSG non dispongono di cellule T mature, cellule B, cellule natural killer (NK), vie di segnalazione multiple di citochine ed hanno molti difetti nell'immunità innata, mentre le nicchie nei tessuti immunologici primari e secondari sono permissive alla colonizzazione da parte di cellule immunitarie umane.

Nei topi NSG sono state inoculate per via sottocutanea  $1 \times 10^7$  cellule HEK293 trasfettate con CLDN18.2. Lo stesso giorno i topi hanno ricevuto  $8 \times 10^6$  PBMC umane arricchite di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, che sono state coltivate per 14 giorni in terreno integrato con ZA. Inoltre, nei topi sono stati iniettati  $50 \mu\text{g/kg}$  ZA e  $5000 \text{ U IL-2}$  (Proleukin). Per mantenere funzionali le cellule T umane, IL-2 è stata somministrata semi-settimanalmente e ZA settimanalmente. Quando i tumori HEK293~CLDN18.2 sono divenuti macroscopicamente visibili, è stato iniziato un trattamento semi-settimanale con  $200 \mu\text{g}$  di IMAB362. Oltre a 9 topi trattati come descritto, sono stati stabiliti due gruppi di topi di controllo. Un gruppo non ha ricevuto cellule T  $\gamma\delta$  umane, l'altro gruppo è stato trattato con un anticorpo di controllo di isotipo anziché con IMAB362. La crescita di tumori CLDN18.2-positivi in topi trattati con IMAB362 in presenza di cellule T  $\gamma\delta$  umane e di ZA è stata inibita significativamente e quasi abrogata, mentre in topi trattati con un anticorpo di controllo di isotipo o privi di cellule T effettrici umane, i tumori sono cresciuti in maniera aggressiva ed è stato necessario sacrificare i topi prematuramente (Figura 25).

Esempio 17: Effetti antitumorali di IMAB362 combinato con la chemioterapia in modelli di tumori di topo

L'attività antitumorale di IMAB362 in combinazione con la chemioterapia è stata esaminata in allo-trapianti sottocutanei di carcinoma gastrico in topi NMRI immunocompetenti non consanguinei usando cellule CLS-103 con trasduzione lentivirale di cldn18.2 murino (CLS-103~cldn18.2).

Tumori di allo-trapianti di CLS-103~cldn18.2 sono stati inoculati mediante iniezione di  $1 \times 10^6$  cellule CLS-103~cldn18.2 per via sottocutanea nel fianco di 10 topi NMRI per ciascun gruppo di trattamento. I topi portanti i tumori sono stati trattati con  $1,25 \text{ mg/kg}$  epirubicina,  $3,25 \text{ mg/kg}$  oxaliplatino e  $56,25 \text{ mg/kg}$  5-fluorouracile (EOF) per via intraperitoneale i giorni 3, 10, 17 e 24 dopo l'inoculo tumorale, seguito da iniezione endovenosa di  $800 \mu\text{g}$  di IMAB362 24 ore dopo ciascuna somministrazione chemioterapica. IL-2 è stata somministrata semi-settimanalmente tramite iniezione

sottocutanea di 3000 IE. Al termine della chemioterapia, il trattamento con IMAB362 e IL-2 è continuato per l'intero periodo di osservazione. Le dimensioni tumorali e la salute degli animali sono state monitorate semi-settimanalmente. I topi venivano sacrificati quando il tumore raggiungeva un volume di 1400 mm<sup>3</sup> oppure quando i tumori diventavano ulcerosi.

Come si può vedere nella Figura 26, topi NMRI portanti tumori CLS-103~cldn18.2 trattati con IMAB362 o EOF da soli non hanno mostrato alcuna inibizione significativa della crescita del tumore rispetto al gruppo di controllo della soluzione salina. Al contrario, la combinazione della chemioterapia EOF e del trattamento con IMAB362 hanno determinato un'inibizione significativamente più elevata della crescita tumorale e una sopravvivenza prolungata dei topi portanti il tumore. Queste osservazioni indicano l'esistenza di effetti terapeutici additivi o addirittura sinergici dati dalla combinazione della chemioterapia EOF e dell'immunoterapia con IMAB362. Il trattamento con IL-2 non ha mostrato alcun effetto sulla crescita del tumore.

**RIVENDICAZIONI**

1. Anticorpo per utilizzo in un metodo di trattamento o di prevenzione di una malattia cancerosa caratterizzata da cellule cancerose che esprimono CLDN18.2, detto anticorpo avendo la capacità di legarsi specificamente a CLDN18.2 sulla superficie cellulare e di mediare l'uccisione di cellule esprimenti CLDN18.2 tramite ADCC e/o CDC, in cui il metodo è una terapia di combinazione con un agente che stabilizza o aumenta l'espressione di CLDN18.2, detto agente essendo scelto dal gruppo consistente di (i) oxaliplatino e 5-fluorouracile, (ii) epirubicina, oxaliplatino e 5-fluorouracile, (iii) 5-fluorouracile, acido folinico e oxaliplatino, (iv) Irinotecano, (v) Docetaxel e (vi) Cisplatino.
2. Anticorpo per utilizzo secondo la rivendicazione 1, in cui il metodo comprende inoltre la somministrazione di un agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$ , in cui detto agente è un bisfosfonato o un agente scelto dal gruppo consistente di acido zoledronico, acido clodronico, acido ibandronico, acido pamidronico, acido risedronico, acido minodronico, acido olpadronico, acido alendronico, acido incadronico e loro sali.
3. Anticorpo per utilizzo secondo la rivendicazione 2, in cui le cellule T  $\gamma\delta$  sono cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2.
4. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 o 3, in cui l'agente che stimola le cellule T  $\gamma\delta$  è somministrato in combinazione con interleuchina-2.
5. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, in cui l'anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 è un anticorpo o una sua variante con una modificazione in una CDR, il quale anticorpo comprende una combinazione di VH e VL, ciascuna comprendente un set di regioni determinanti la complementarità CDR1, CDR2 e CDR3 scelto dalle seguenti forme di realizzazione (i) a (ix):
  - (i) VH: CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 14, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 14, CDR3: posizioni 116-125 di SEQ ID NO: 14, VL: CDR1: posizioni 49-53 di SEQ ID NO: 21, CDR2: posizioni 71-73 di SEQ ID NO: 21, CDR3: posizioni 110-118 di SEQ ID NO: 21,
  - (ii) VH: CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 15, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 15, CDR3: posizioni 116-126 di SEQ ID NO: 15, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 20, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 20, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO: 20,
  - (iii) VH: CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 16, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 16, CDR3: posizioni 116-124 di SEQ ID NO: 16, VL: CDR1: posizioni 47-52 di SEQ ID NO: 22, CDR2: posizioni 70-72 di SEQ ID NO: 22, CDR3: posizioni 109-117 di SEQ ID NO: 22,

22,

(iv) VH: CDR1: posizioni 44-51 di SEQ ID NO: 18, CDR2: posizioni 69-76 di SEQ ID NO: 18, CDR3: posizioni 115-125 di SEQ ID NO:

18, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 25, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 25, CDR3: posizioni 115-122 di SEQ ID NO:

25,

(v) VH: CDR1: posizioni 45-52 di SEQ ID NO: 17, CDR2: posizioni 70-77 di SEQ ID NO: 17, CDR3: posizioni 116-126 di SEQ ID NO:

17, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 24, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 24, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO:

24,

(vi) VH: CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID NO:

19, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 23, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 23, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO:

23,

(vii) VH: CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID NO:

19, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 26, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 26, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID NO:

26,

(viii) VH: CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID

NO: 19, VL: CDR1: posizioni 47-58 di SEQ ID NO: 27, CDR2: posizioni 76-78 di SEQ ID NO: 27, CDR3: posizioni 115-123 di SEQ ID

NO: 27, e

(ix) VH: CDR1: posizioni 45-53 di SEQ ID NO: 19, CDR2: posizioni 71-78 di SEQ ID NO: 19, CDR3: posizioni 117-128 di SEQ ID NO:

19, VL: CDR1: posizioni 47-52 di SEQ ID NO: 28, CDR2: posizioni 70-72 di SEQ ID NO: 28, CDR3: posizioni 109-117 di SEQ ID NO:

28.

6. Anticorpo per utilizzo secondo la rivendicazione 5, in cui la modificazione comprende 1-5 sostituzioni nelle CDR.
7. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui detto anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 e di mediare l'uccisione di cellule esprimenti CLDN18.2 tramite ADCC e/o CDC comprende una combinazione di una regione variabile a catena pesante (VH) e di una regione variabile a catena leggera (VL) scelta dalle seguenti possibilità (i) a (ix):
  - (i) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 29 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 36 o da un suo frammento,

- (ii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 30 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 35 o da un suo frammento,
- (iii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 31 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 37 o da un suo frammento,
- (iv) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 33 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 40 o da un suo frammento,
- (v) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 32 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 39 o da un suo frammento,
- (vi) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 38 o da un suo frammento,
- (vii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 41 o da un suo frammento,
- (viii) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 42 o da un suo frammento, e
- (ix) la VH comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 34 o da un suo frammento e la VL comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 43 o da un suo frammento.
8. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui detto anticorpo avente la capacità di legarsi a CLDN18.2 e di mediare l'uccisione di cellule esprimenti CLDN18.2 tramite ADCC e/o CDC comprende una combinazione di catene pesanti e di catene leggere scelte dalle seguenti possibilità (i) a (ix):
- (i) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 14 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 21 o da un suo frammento,
- (ii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 15 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 20 o da un suo frammento,
- (iii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 16 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 22 o da un suo frammento,

- (iv) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 18 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 25 o da un suo frammento,
- (v) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 17 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 24 o da un suo frammento,
- (vi) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 23 o da un suo frammento,
- (vii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 26 o da un suo frammento,
- (viii) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 27 o da un suo frammento, e
- (ix) la catena pesante comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 19 o da un suo frammento e la catena leggera comprende una sequenza amminoacidica rappresentata da SEQ ID NO: 28 o da un suo frammento.
9. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 8, in cui il cancro è un adenocarcinoma, in particolare un adenocarcinoma in fase avanzata.
10. Anticorpo per utilizzo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 9, in cui il cancro è scelto dal gruppo consistente di cancro dello stomaco, cancro dell'esofago, in particolare della parte inferiore dell'esofago, cancro della giunzione eso-gastrica e cancro gastroesofageo.

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

## LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

## TAVOLA 1/29

“Figure 1” = Figura 1

“... cell cycle” = ... ciclo cellulare

“... med cell cycle” = ... terr. ciclo cellulare

“% cells” = % cellule

“medium” = terreno

“G2-Phase” = Fase G2

“S-Phase” = Fase S

“G1-Phase” = Fase G1

## TAVOLA 2/29

“Figure 1” = Figura 1

“medium” = terreno

“Oxaliplatin” = Oxaliplatino

“Epirubicin” = Epirubicina

“% of Max” = % del Max.

“Isotype Co” = Cont. Isotipo

## TAVOLA 3/29

“Figure 2” = Figura 2

“untreated” = non trattate

“relative expression” = espressione relativa

“Actin” = Actina

“Relative intensity” = Intensità relativa

## TAVOLA 4/29

“Figure 2” = Figura 2

“untreated” = non trattate

“isotype control” = controllo isotipo

“% of Max” = % del Max.

TAVOLA 5/29

“Figure 3” = Figura 3

“% cells” = % cellule

“medium” = terreno

“Irinotecan” = Irinotecano

TAVOLA 6/29

“Figure 4” = Figura 4

“% specific lysis” = % lisi specifica

TAVOLA 7/29

“Figure 5” = Figura 5

“cell growth percentage of med” = crescita cellulare percentuale del terreno

“medium” = terreno

“Irinotecan” = Irinotecano

“Cisplatin” = Cisplatino

TAVOLA 8/29

“Figure 5” = Figura 5

“specific killing” = uccisione specifica

“Med” = Terr.

TAVOLA 9/29

“Figure 6” = Figura 6

“Isotype control” = Controllo isotipo

“specific killing” = uccisione specifica



## TAVOLA 10/29

“Figure 7” = Figura 7

“specific killing” = uccisione specifica

## TAVOLA 11/29

“Figure 8” = Figura 8

“IL-2 dependent proliferation of PBMCs *in vitro*” = Proliferazione IL-2-dipendente di PBMC *in vitro*

“ZA dependent proliferation of PBMCs *in vitro*” = Proliferazione ZA-dipendente di PBMC *in vitro*

“Cell numbers” = Numeri cellulari

“Days” = Giorni

## TAVOLA 12/29

“Figure 9” = Figura 9

“... T cells” = cellule T ...

“Enrichment of V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells after 14 days” = Arricchimento di cellule T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 dopo 14 giorni

“Enrichment (day 14)” = Arricchimento (giorno 14)

“PBMCs” = PBMC

“Day ...” = Giorno ...

“... cells in CD3+ lymphocytes” = Cellule ... in linfociti CD3+

## TAVOLA 13/29

“Figure 10” = Figura 10

“... T cells” = Cellule T ...

“ADCC with ... T cells and IMAB362 on NUGC-4” = ADCC con cellule T ... e IMAB362 su NUGC-4

“Enrichment” = Arricchimento

“Specific killing” = Uccisione specifica

“Donor ...” = Donatore ...

## TAVOLA 14/29

“Figure 11” = Figura 11

“Monocyte-dependent development of ... T cells” = Sviluppo monocita-dipendente di cellule T ...

“Enrichment in ... T cells” = Arricchimento di cellule T ...

“Exp.” = Esp.

“Cytotoxicity of ... T cells induced by ZA-pulsed cancer cell lines” = Citotossicità di cellule T ... indotte da linee cellulari cancerose pulsate con ZA

“Proliferation of ... T cells induced by ZA-pulsed cancer cells” = Proliferazione di cellule T ... indotte da cellule cancerose pulsate con ZA

“% cytotoxic activity of ... T cells” = % attività citotossica di cellule T ...

“3H thymidine incorporation” = incorporazione di 3H timidina

“Donor#” = Donatore#

TAVOLA 15/29

“Figure 12” = Figura 12

“Cell types” = Tipi cellulari

“NK cells” = cellule NK

“... T cells” = cellule T ...

“In % of lymphocytes” = In % di linfociti

“buffy coat” = strato leucocitario

“PBMCs” = PBMC

“day ...” = giorno ...

TAVOLA 16/29

“Figure 13” = Figura 13

“ZA/IL-2-induced development of ... EM cells” = Sviluppo ZA/IL-2-indotto di cellule EM ...

“ZA/IL-2-induced development of cytolytic ... EM cells” = Sviluppo ZA/IL-2-indotto di cellule citolitiche EM ...

“% in Lymphocytes” = % in Linfociti

“PBMCs” = PBMC

“ZA/IL-2-induced accumulation of cytolytic ... T cells” = Accumulo ZA/IL-2-indotto di cellule T citolitiche ...

“ZA/IL-2-induced CD16/CD56 expression in CD3+ lymphocytes” = Espressione ZA/IL-2-indotta di CD16/CD56 in linfociti CD3+

“... NK cells” = Cellule NK ...

TAVOLA 17/29

“Figure 14” = Figura 14

“Specific killing” = Uccisione specifica

“Max. specific killing” = Uccisione specifica max.

“log IMAB362 concentration” = concentrazione log di IMAB362

TAVOLA 18/29

“Figure 15” = Figura 15

“Specific killing” = Uccisione specifica

“PBMCs” = PBMC

“day ...” = giorno ...

“... T cells” = cellule T ...

TAVOLA 19/29

“Figure 16” = Figura 16

“Count” = Conte

“filled: imab 362” = pieno: imab 362

“non filled: isotyp control” = vuoto: controllo isotipo

TAVOLA 20/29

“Figure 17” = Figura 17

TAVOLA 21/29

“Figure 18” = Figura 18

“Image” = Immagine

“Efficiency” = Efficienza

“Color Bar” = Barra di colori

## TAVOLA 22/29

“Figure 19” = Figura 19

“Isotype control” = Controllo di isotipo

“Saline control” = Controllo soluzione salina

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days after tumor inoculation” = Giorni dopo l’inoculo tumorale

## TAVOLA 23/29

“Figure 20” = Figura 20

“Isotype control” = Controllo di isotipo

“Saline control” = Controllo soluzione salina

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days after tumor inoculation” = Giorni dopo l’inoculo tumorale

## TAVOLA 24/29

“Figure 21” = Figura 21

“Saline control” = Controllo soluzione salina

“Tumor volume” = Volume tumorale

“Days post graft” = Giorni post-innesto

## TAVOLA 25/29

“Figure 22” = Figura 22

“Saline control” = Controllo soluzione salina

“Tumor volume” = Volume tumorale

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days post graft” = Giorni post-innesto

## TAVOLA 26/29

“Figure 23” = Figura 23

“EOF + saline control” = EOF + controllo soluzione salina

“Tumor volume” = Volume tumorale

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days post graft” = Giorni post-innesto

TAVOLA 27/29

“Figure 24” = Figura 24

“EOF + saline control” = EOF + controllo soluzione salina

“Tumor volume” = Volume tumorale

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days post graft” = Giorni post-innesto

TAVOLA 28/29

“Figure 25” = Figura 25

“vehicle” = veicolo

“tumor volume” = volume tumorale

“d...” = g...

“days of treatment” = giorni di trattamento

TAVOLA 29/29

“Figure 26” = Figura 26

“Growth Saline Control” = Crescita Controllo Soluzione Salina

“Growth 800µg IMAB362” = Crescita 800µg IMAB362

“tumor volume” = volume tumorale

“Day” = Giorno

“Growth Saline Control + EOF” = Crescita Controllo Soluzione Salina + EOF

“Growth 800µg IMAB362 + EOF” = Crescita 800µg IMAB362 + EOF

“Kaplan-Meier survival plot” = diagramma di sopravvivenza di Kaplan-Meier

“Saline control” = Controllo soluzione salina

“Saline control + EOF” = Controllo soluzione salina + EOF

“Percent survival” = Sopravvivenza percentuale

“Days post graft” = Giorni post-innesto

\* \* \* \* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

  
Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Figure 1

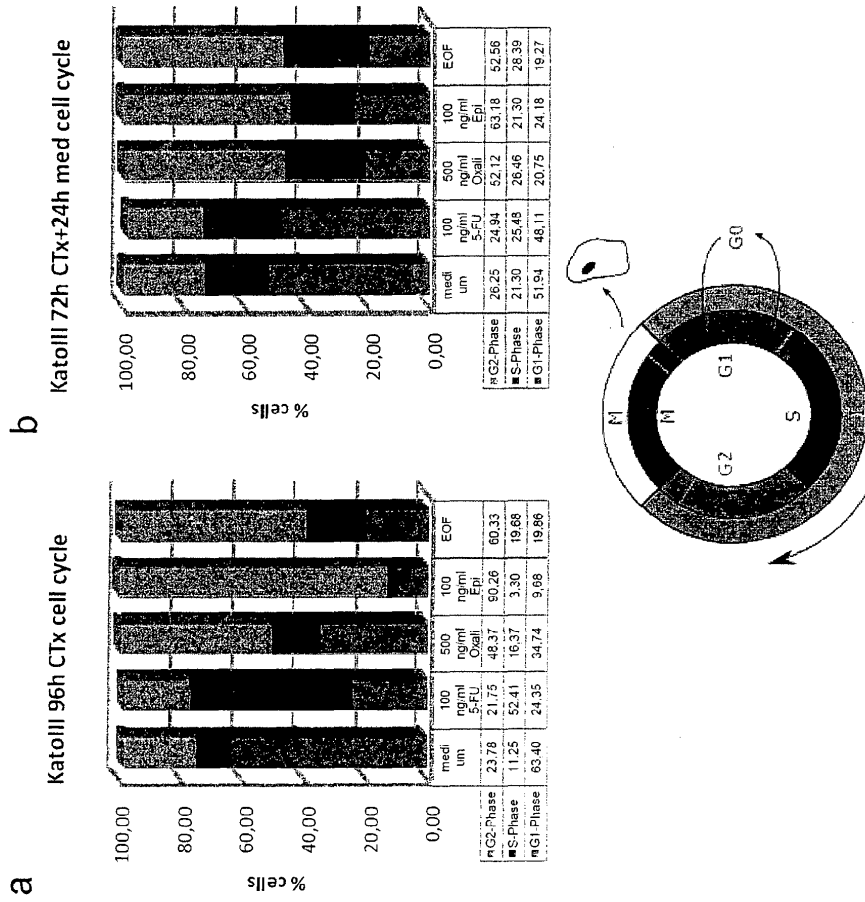
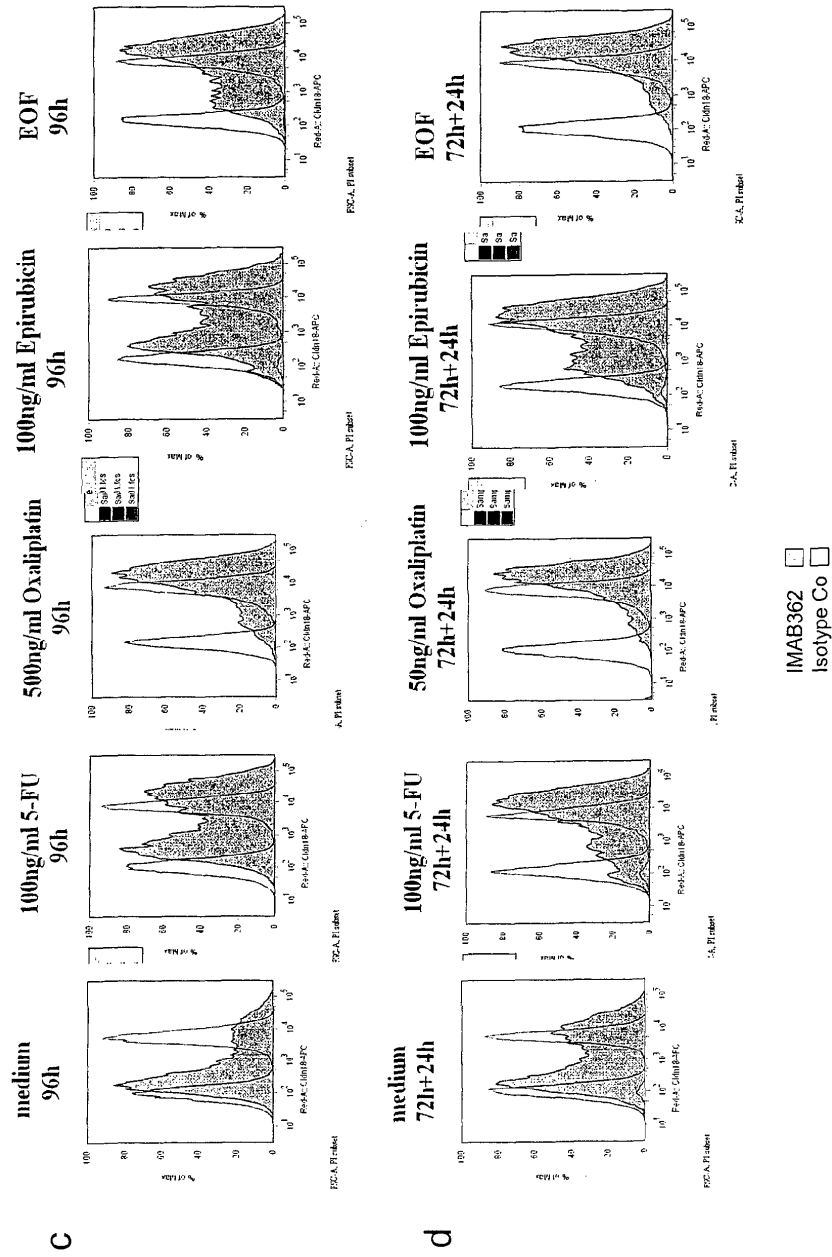


Figure 1





3/29

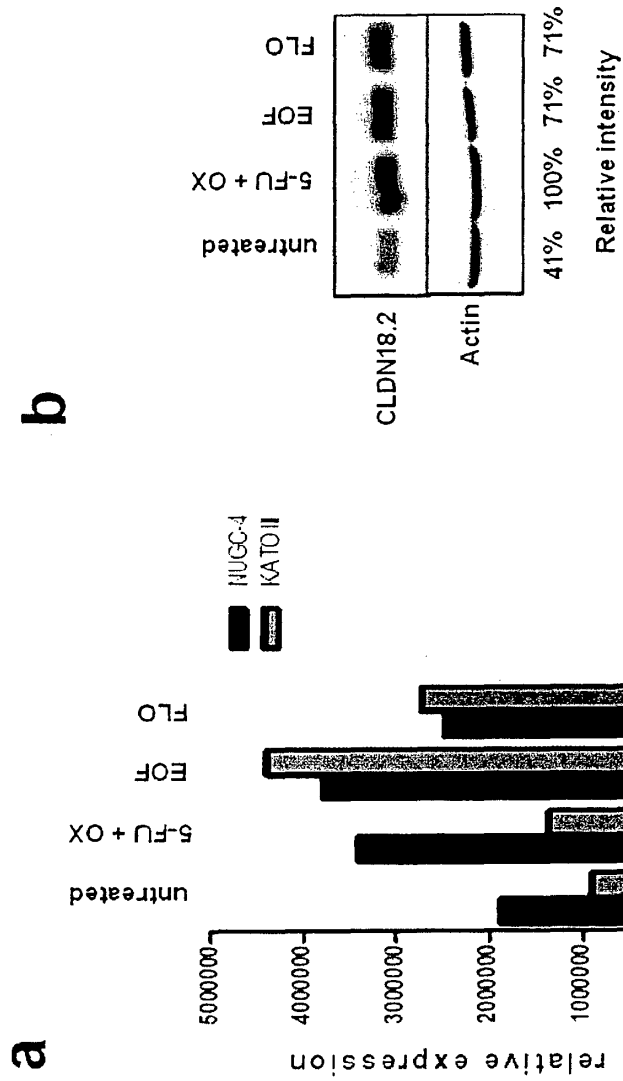
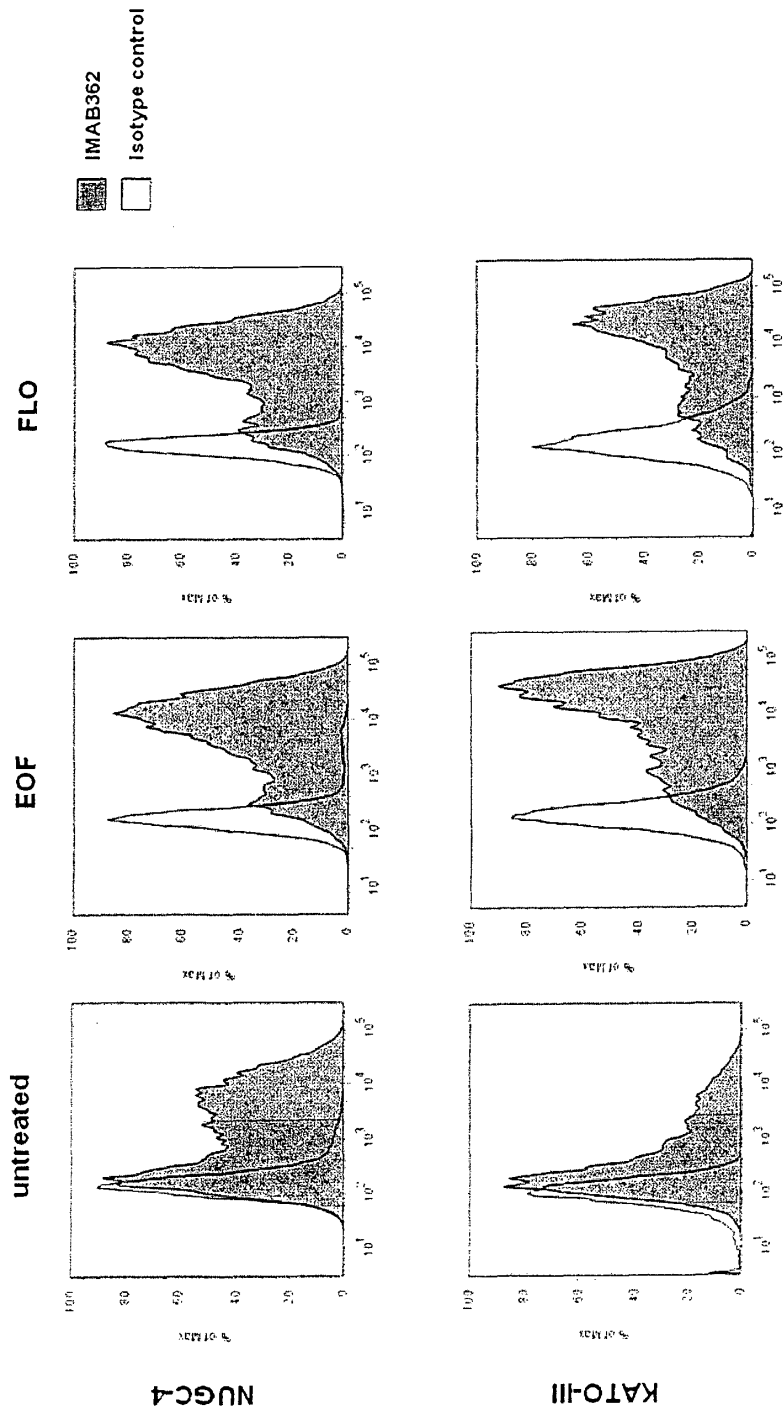


Figure 2

Figure 2

C



5/29

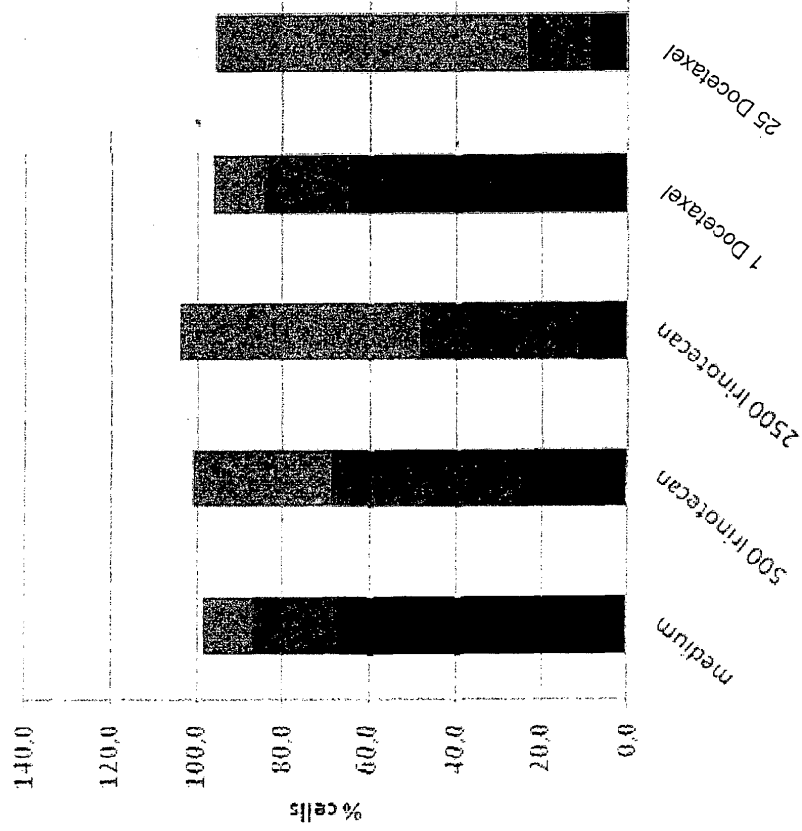
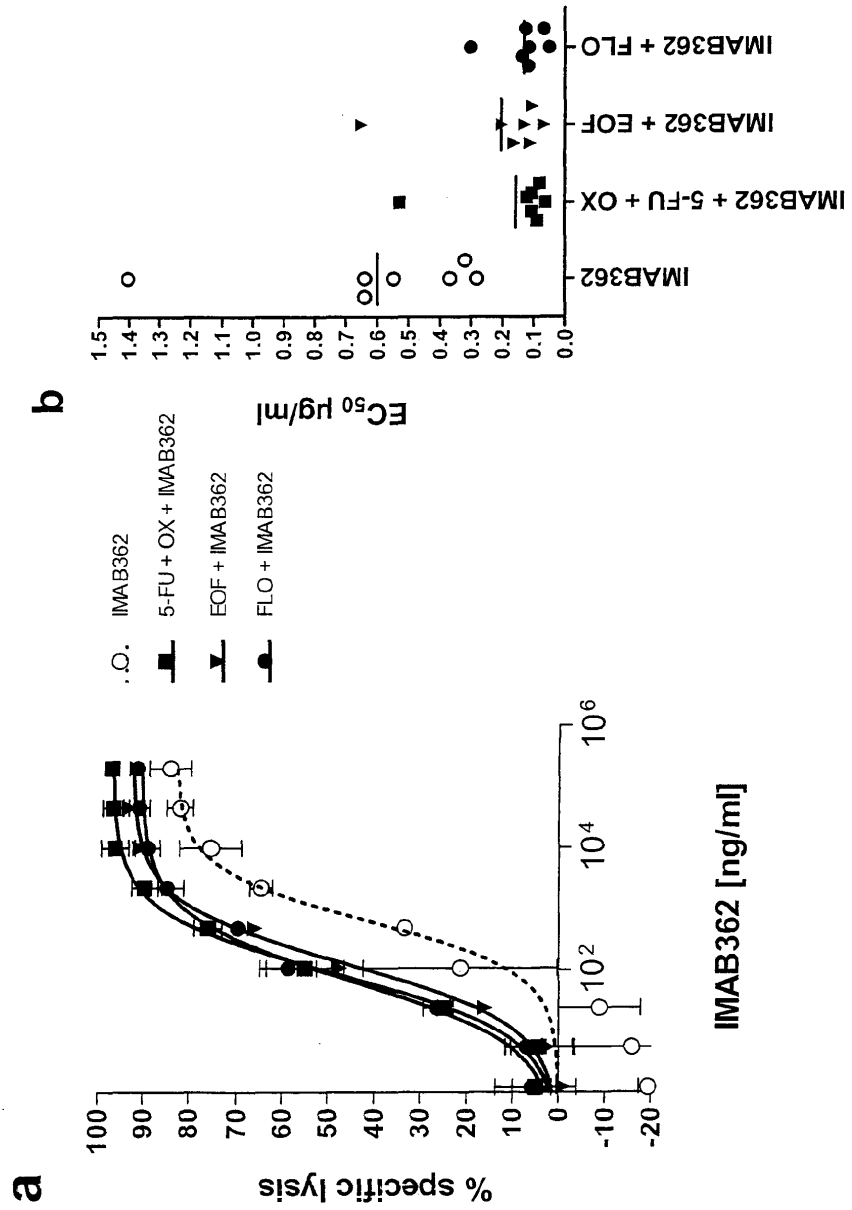


Figure 3

Figure 4



7/29

Figure 5

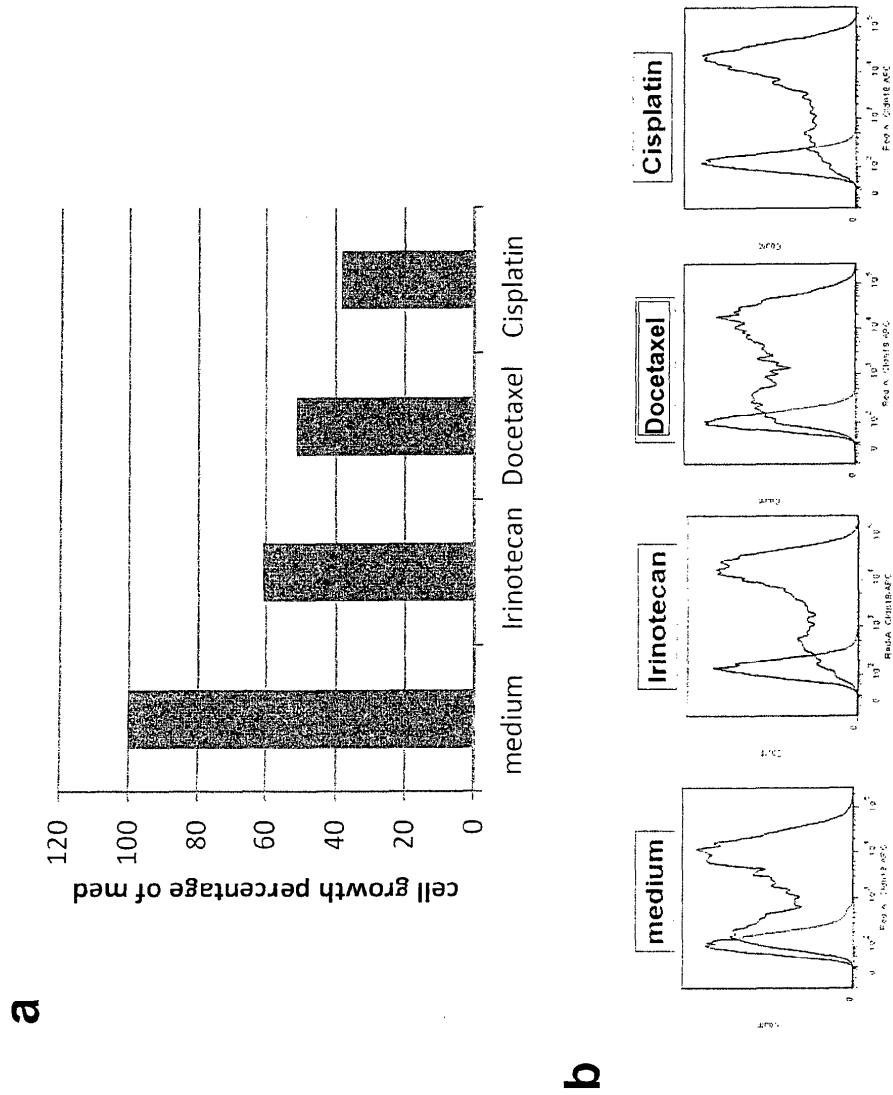
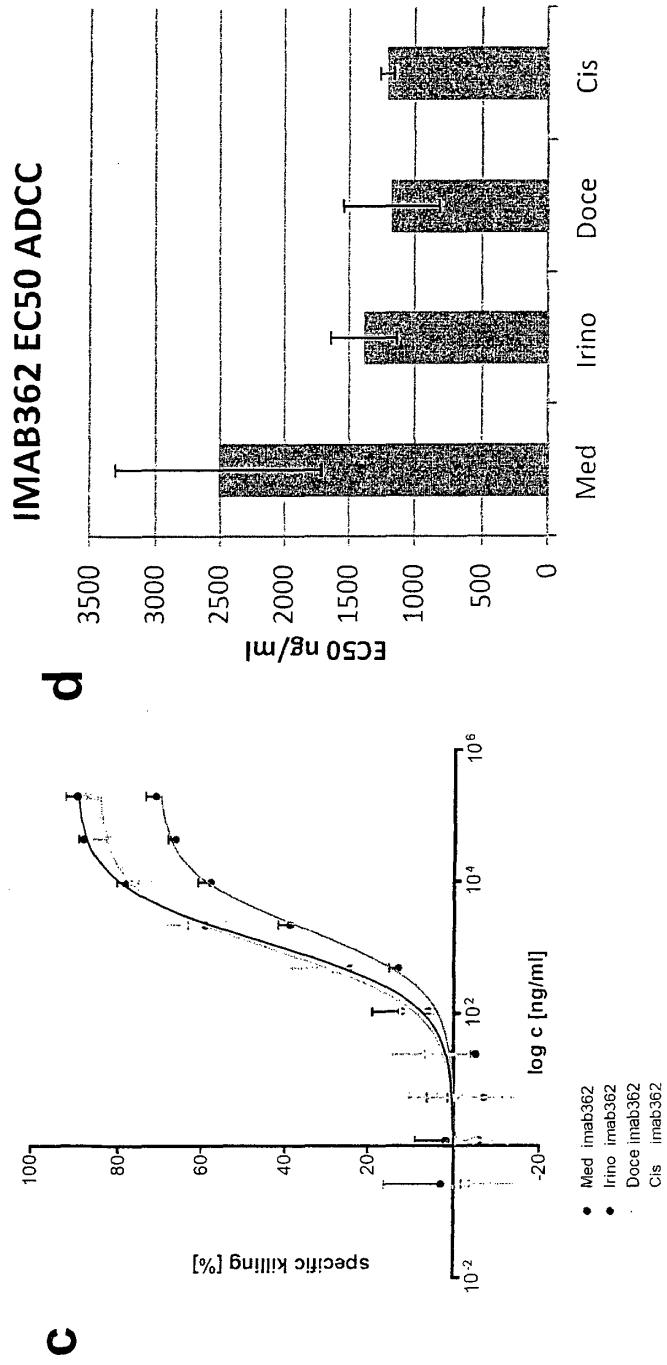


Figure 5



9/29

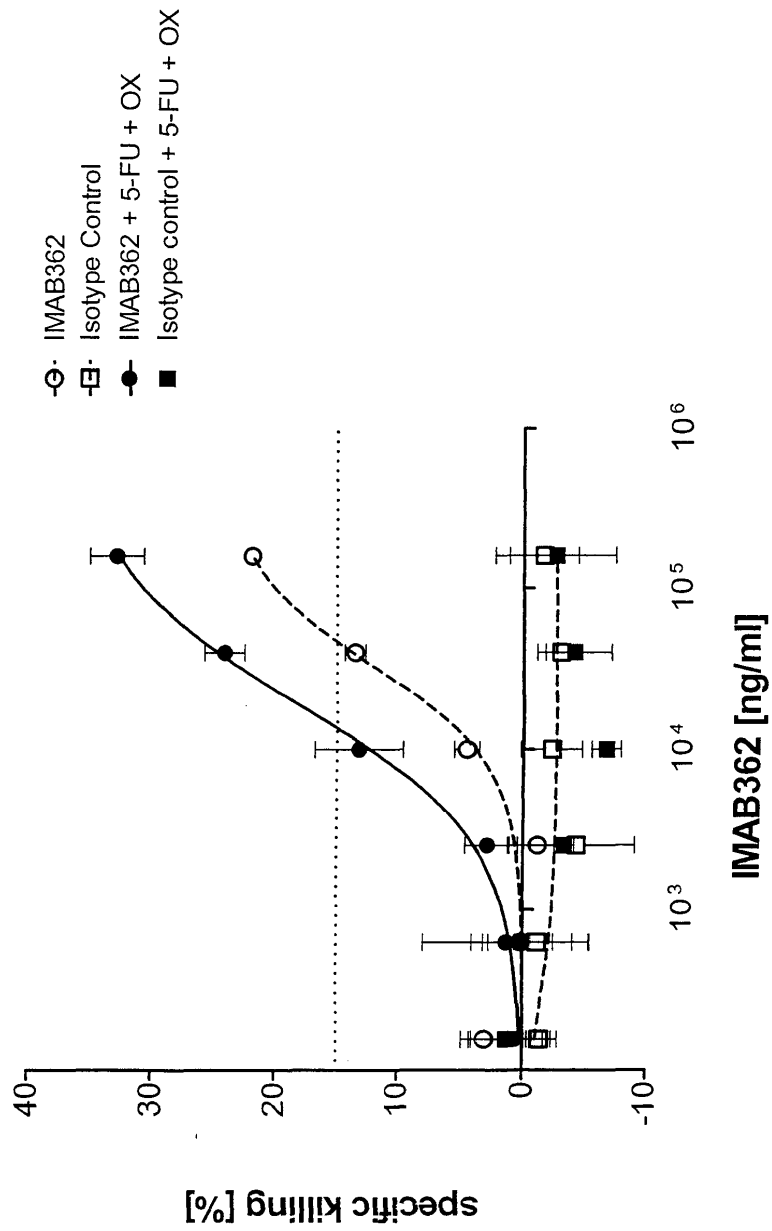


Figure 6

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

10/29

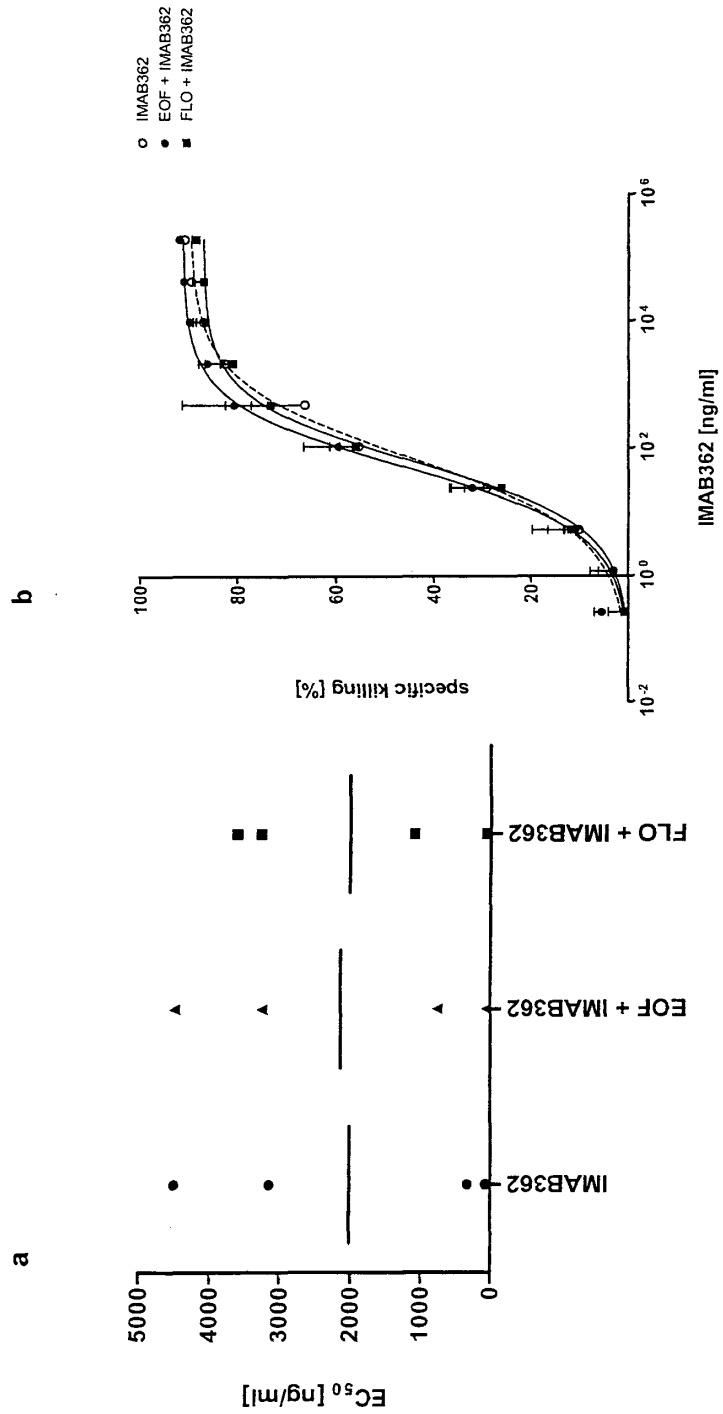
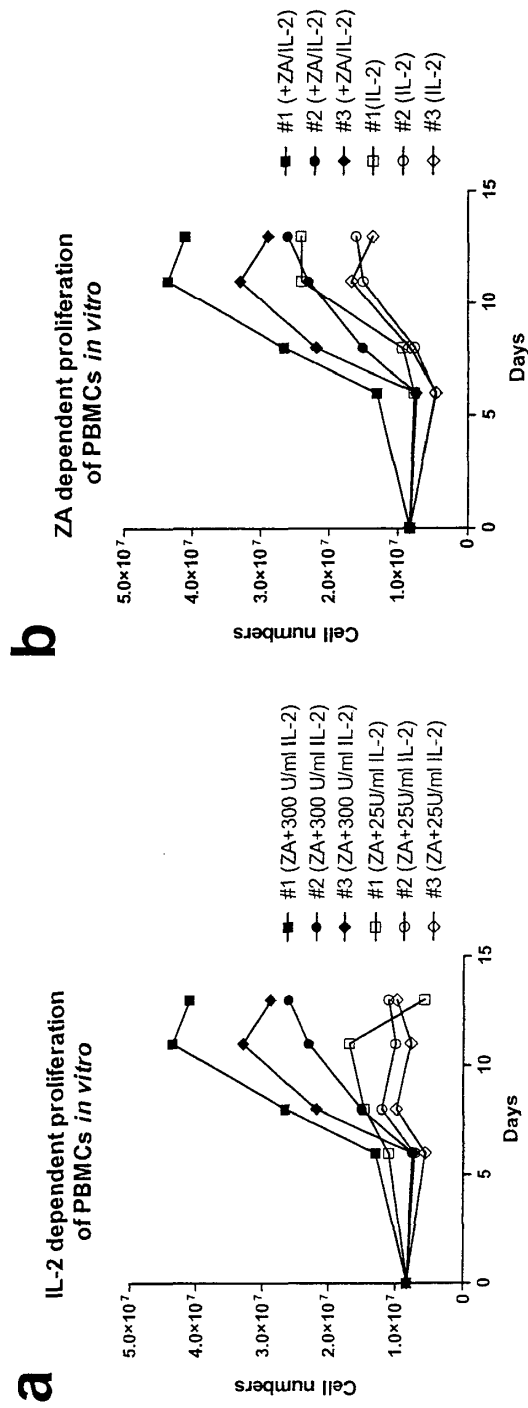


Figure 7



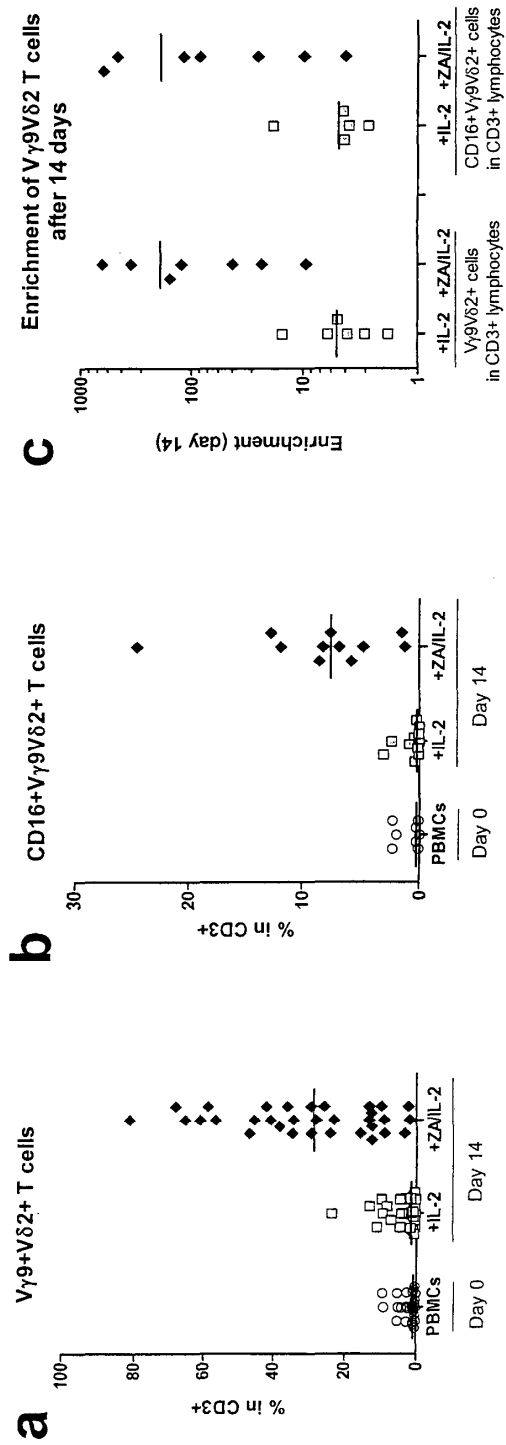
11/29

Figure 8



12/29

Figure 9



13/29

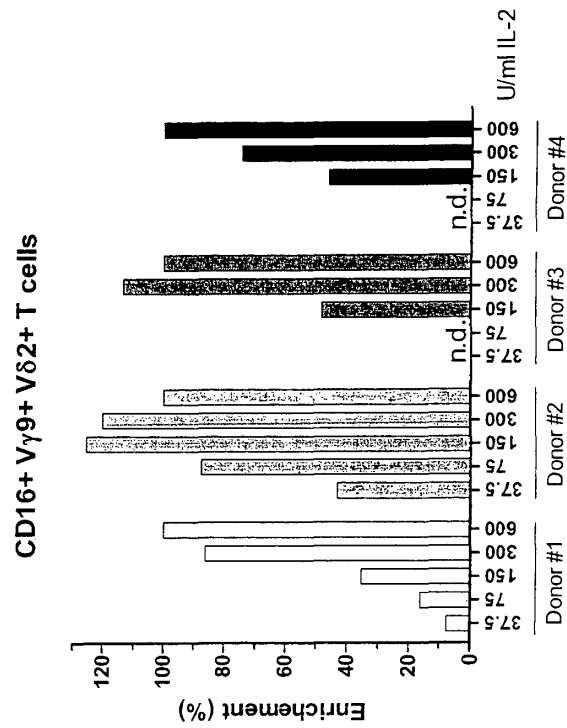
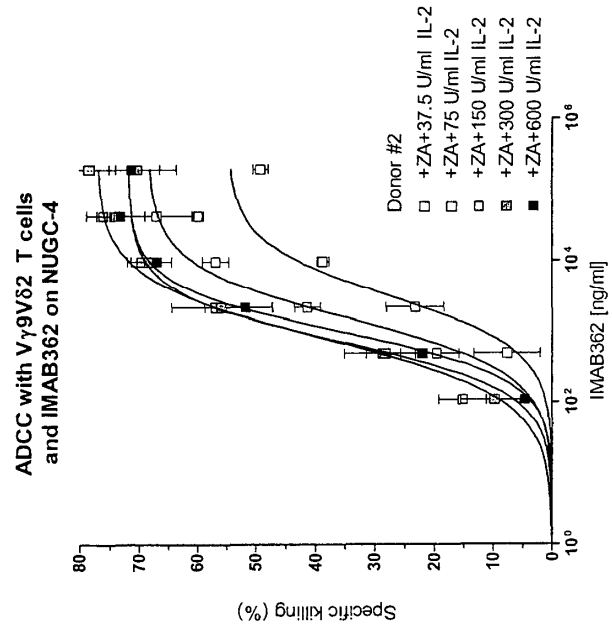
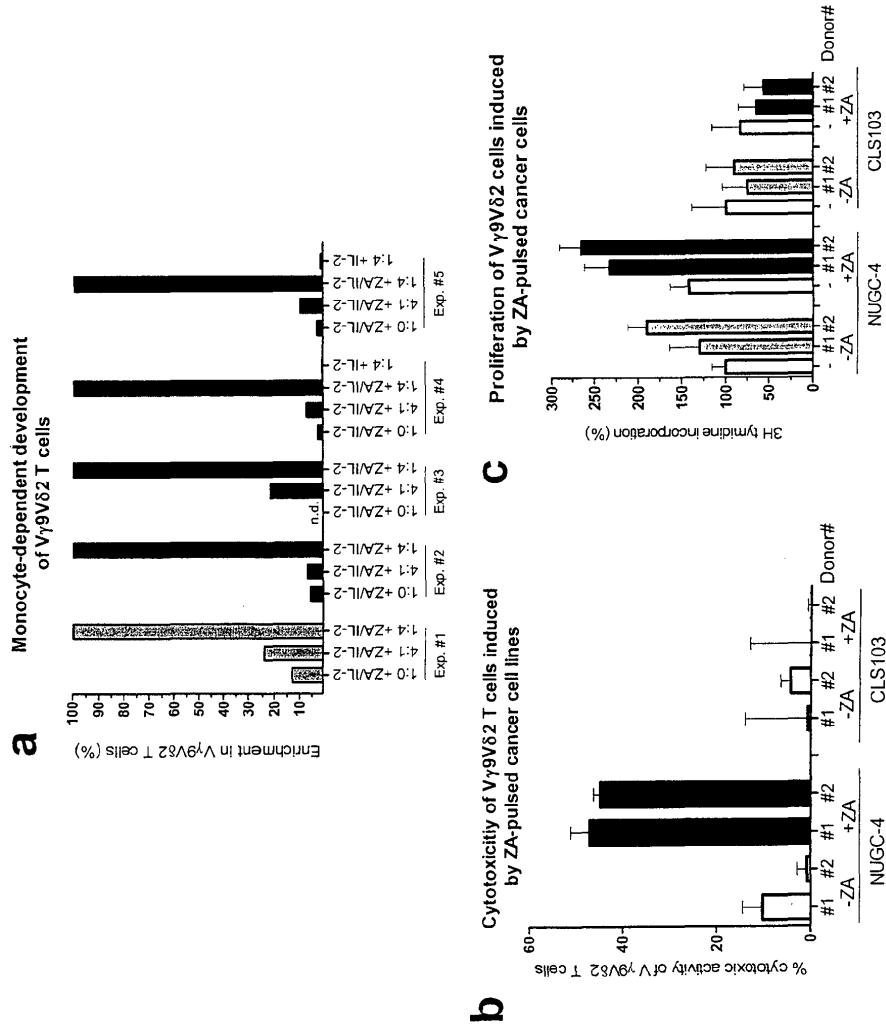


Figure 10

Figure 11



15/29

Figure 12

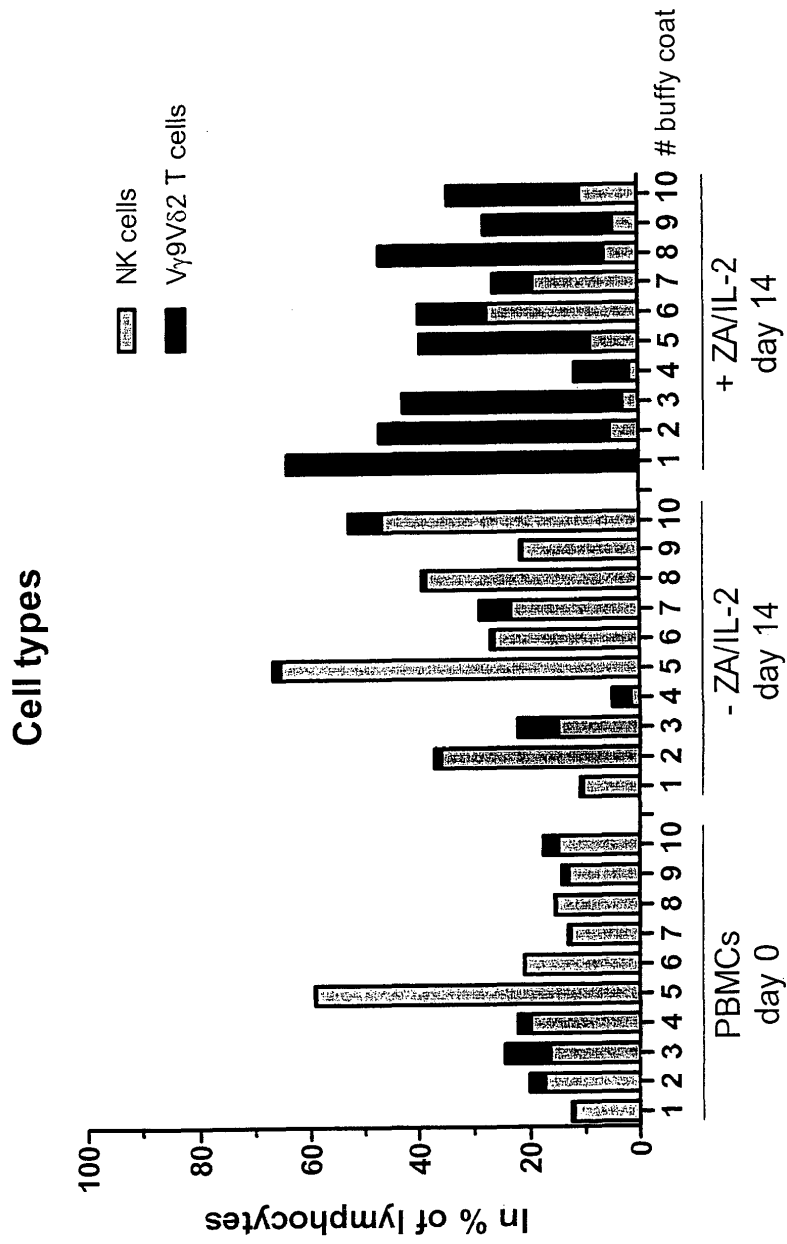
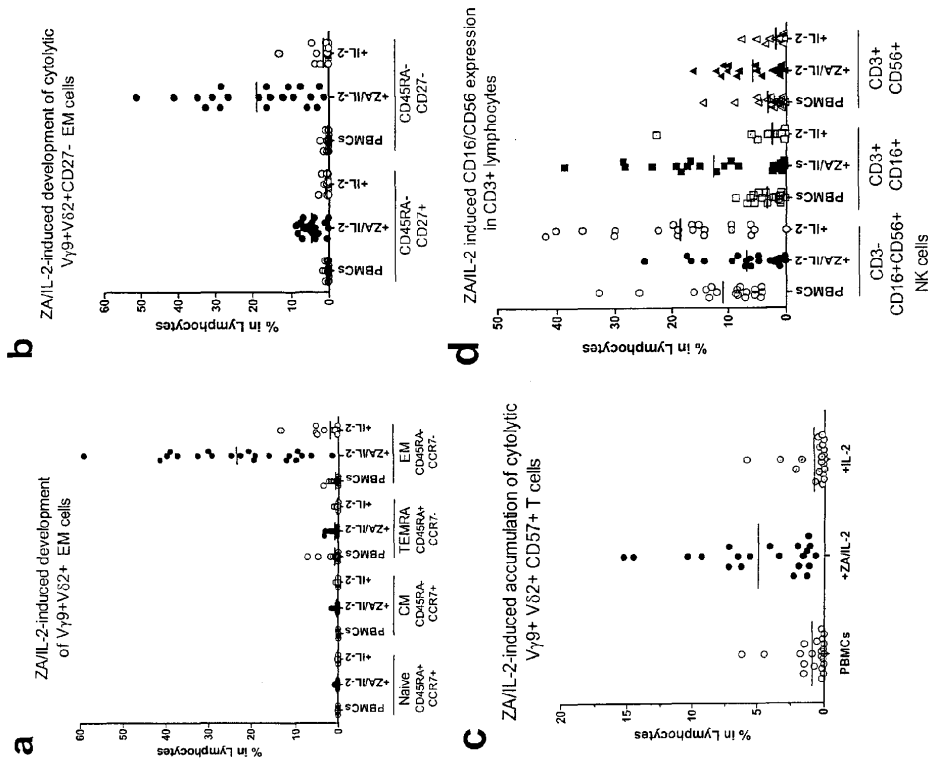
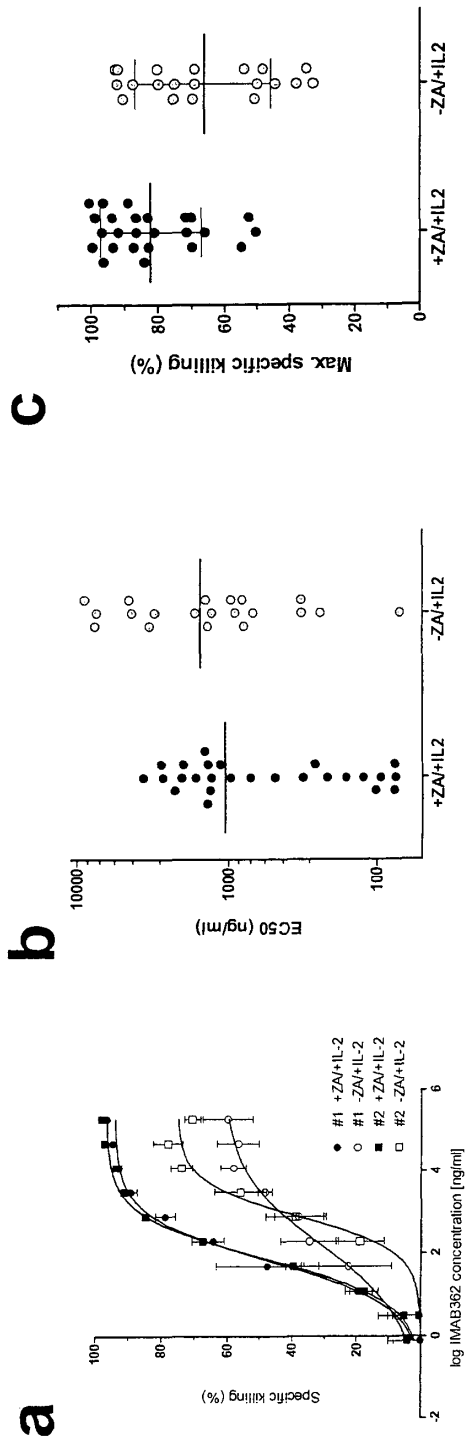


Figure 13



17/29

Figure 14



18/29

Figure 15

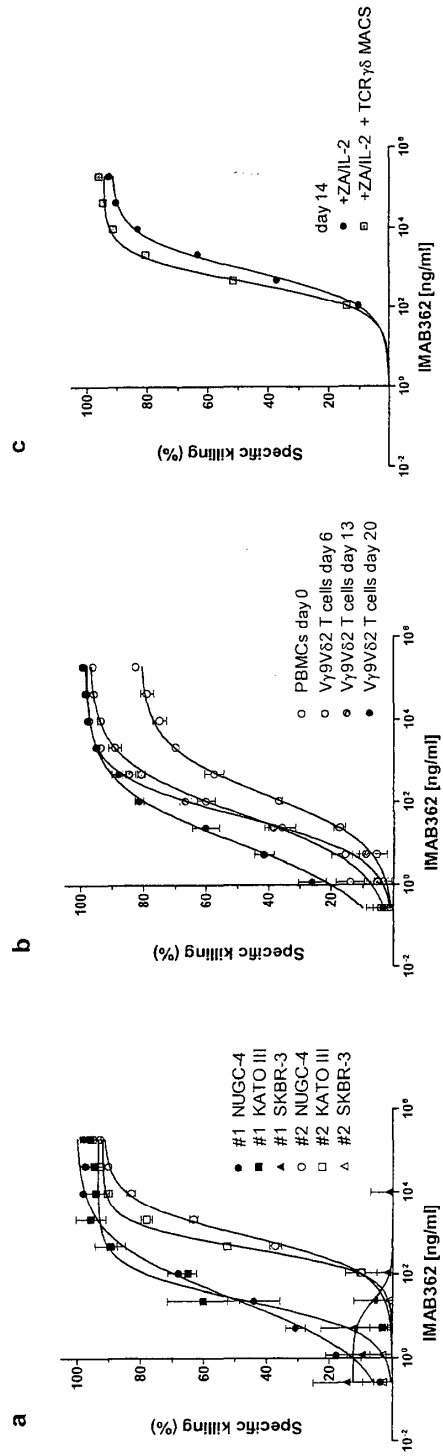
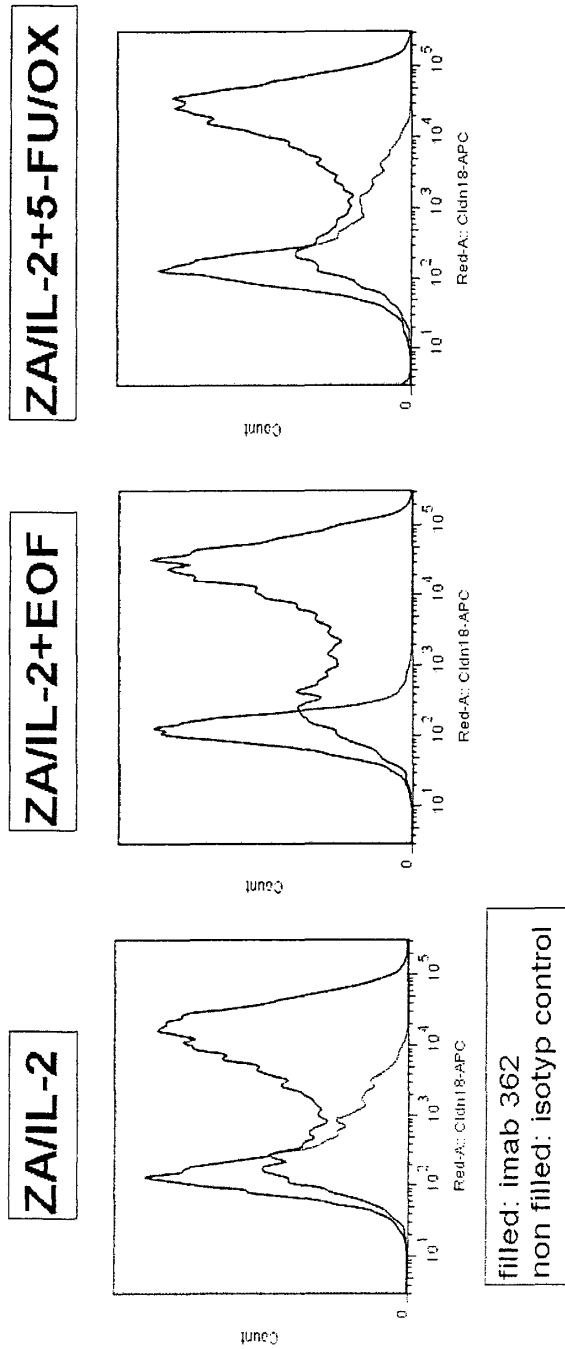




Figure 16



20/29

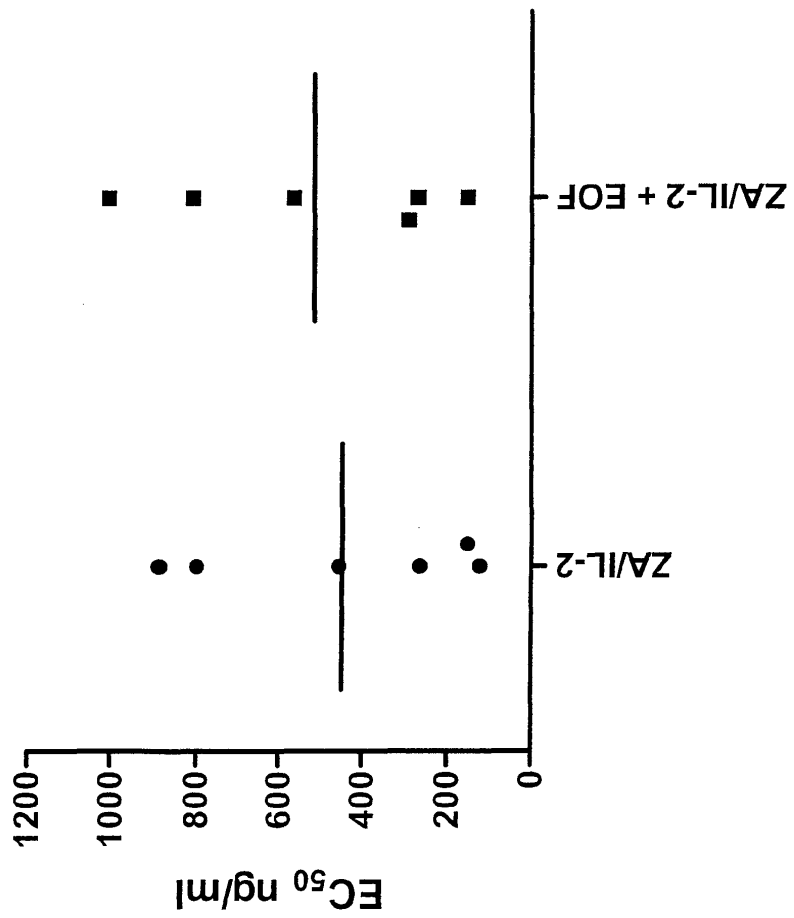
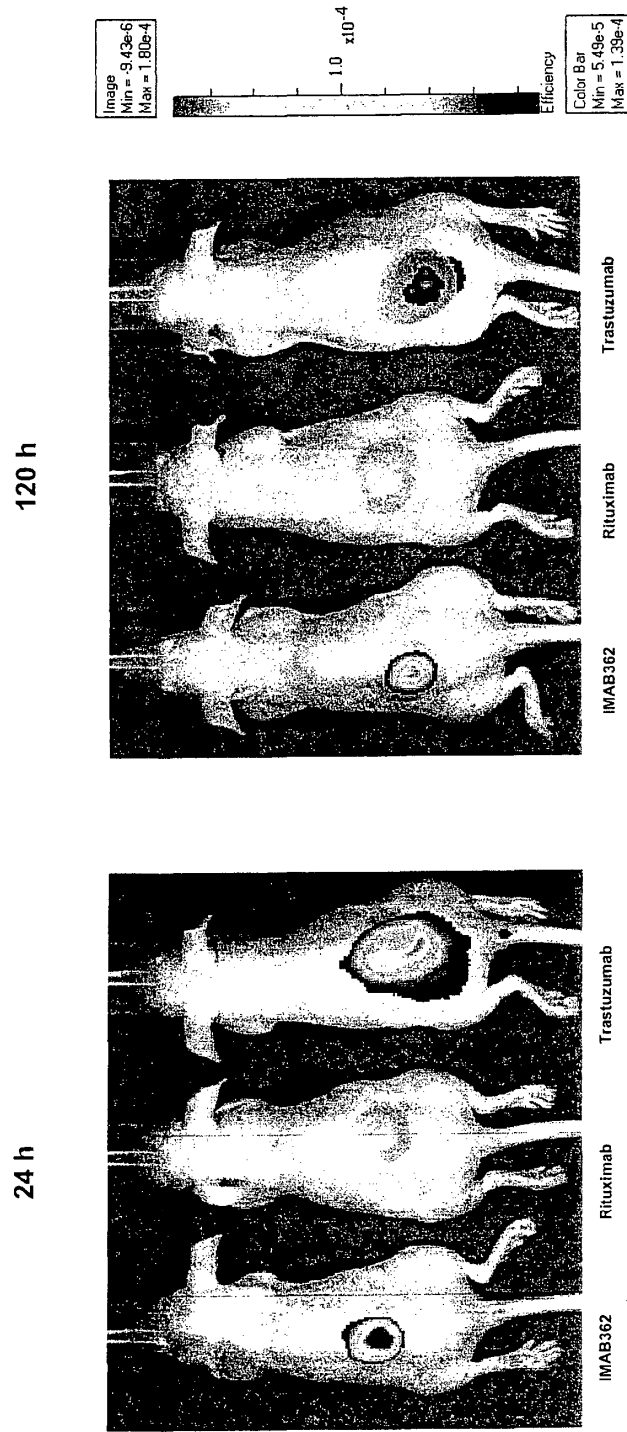


Figure 17

Figure 18



22/29

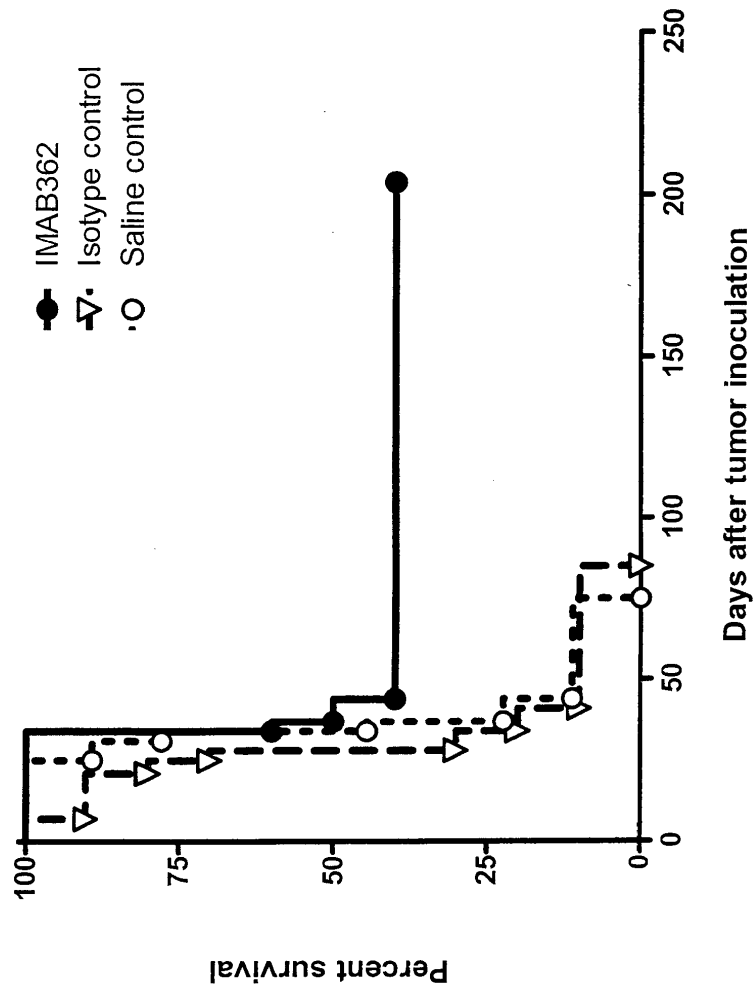


Figure 19

23/29

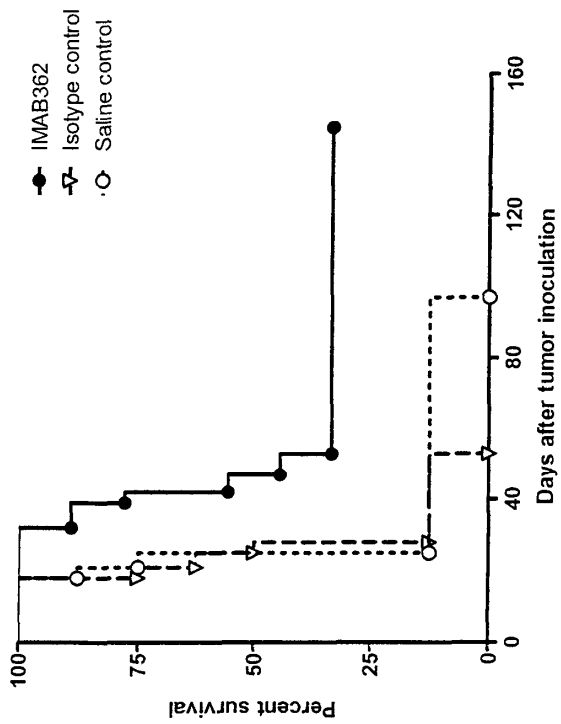
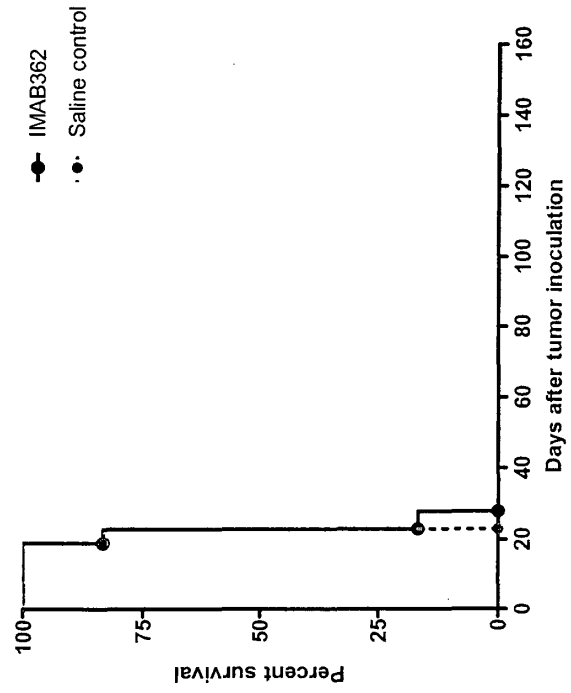
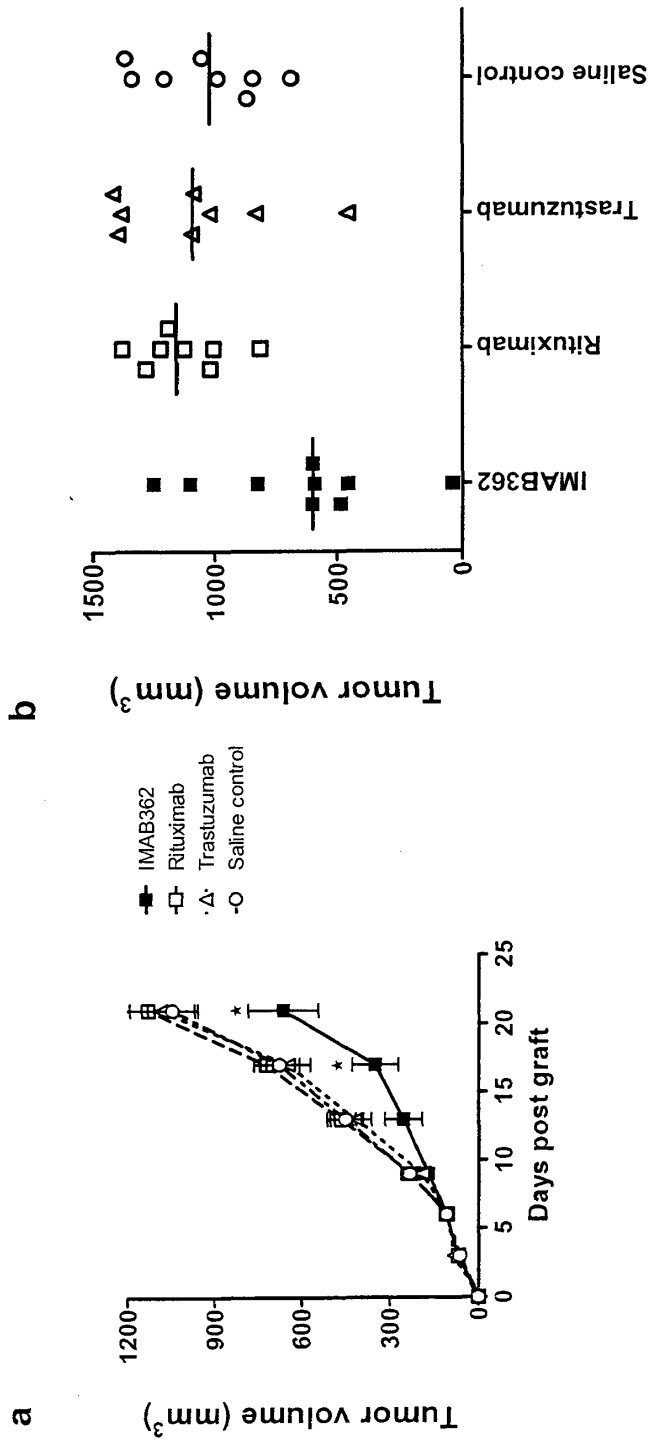


Figure 20

24/29

Figure 21



25/29

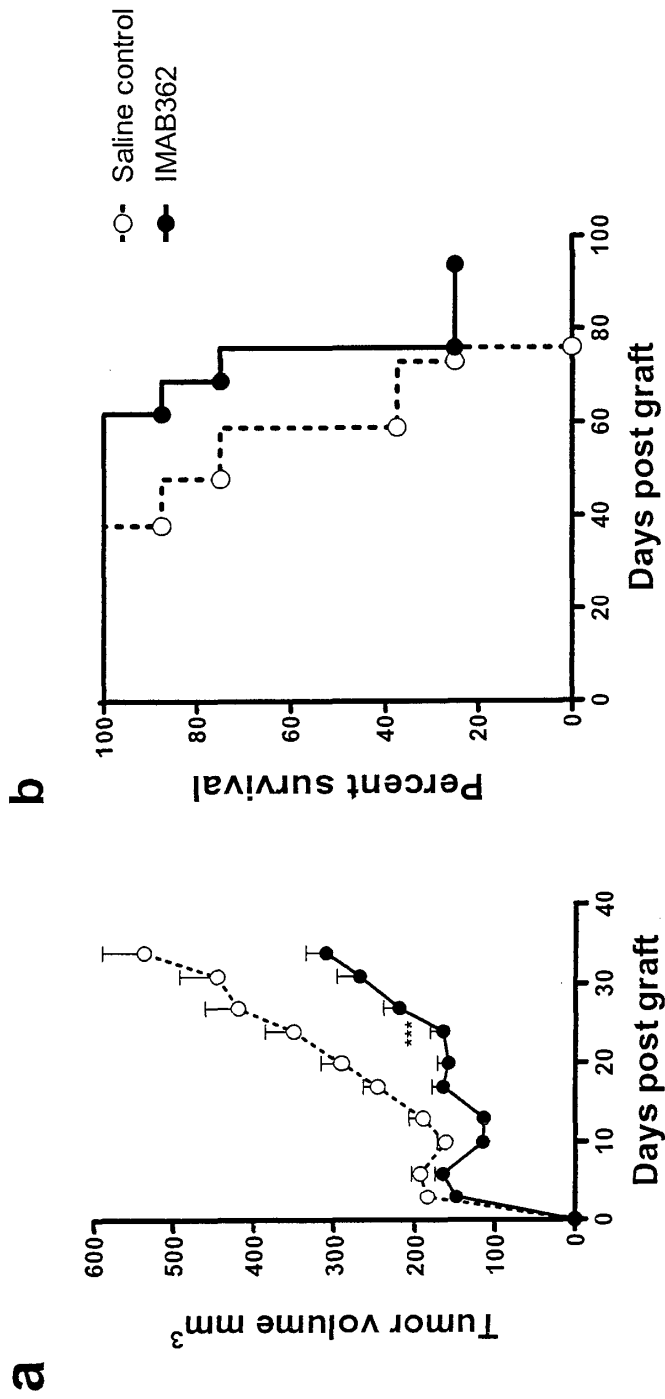


Figure 22

26/29

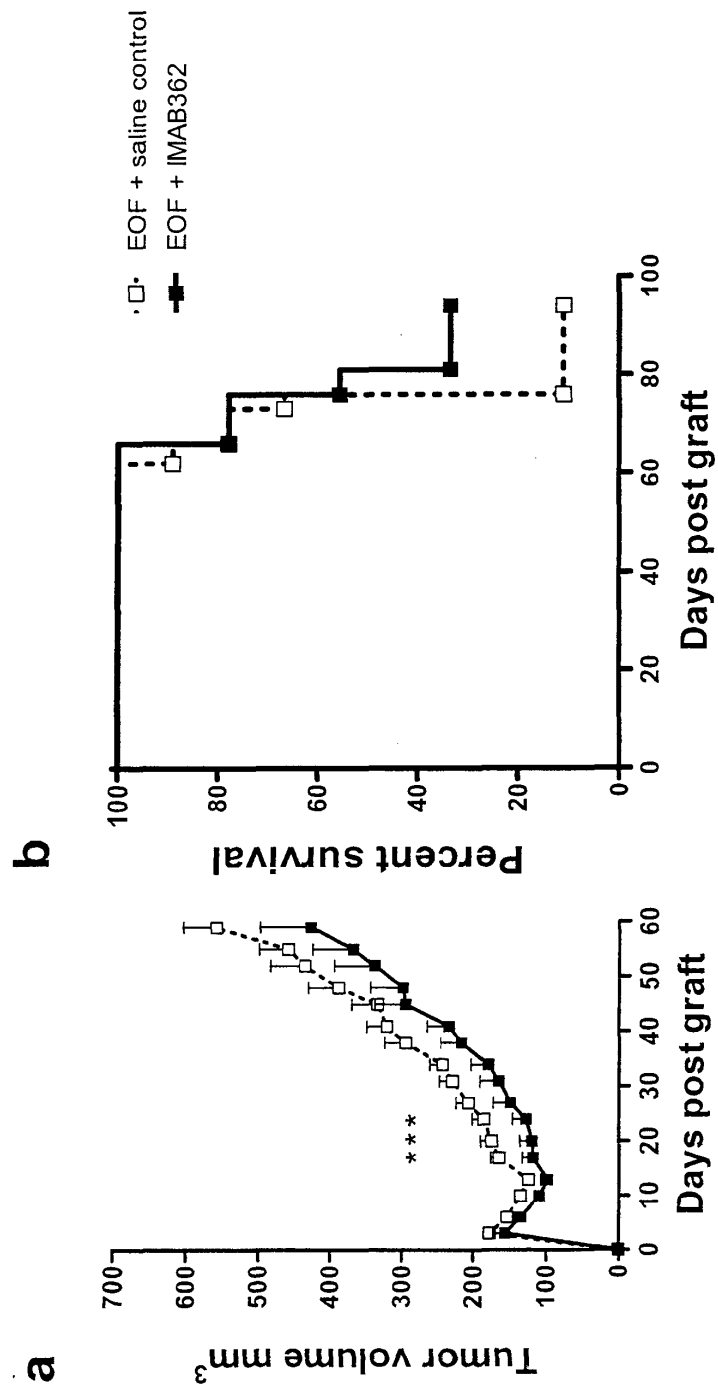


Figure 23



27/29

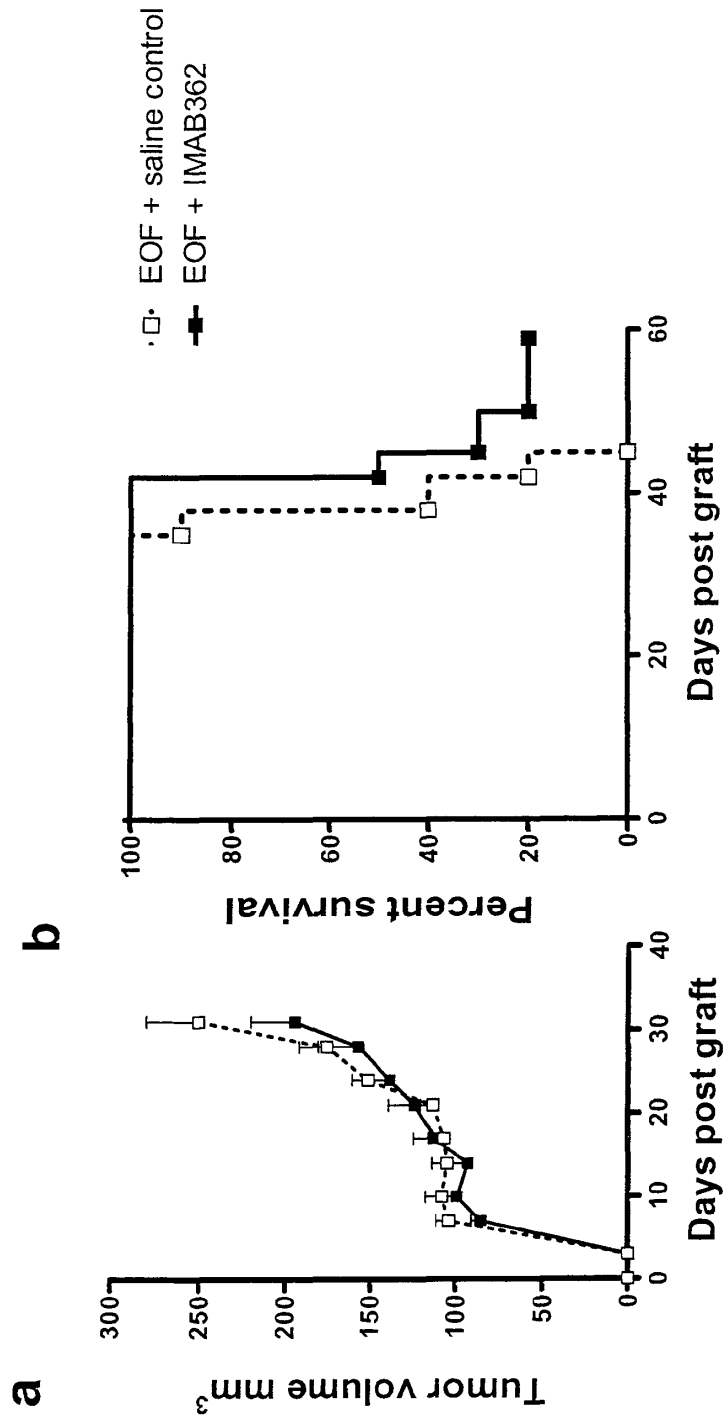


Figure 24

28/29

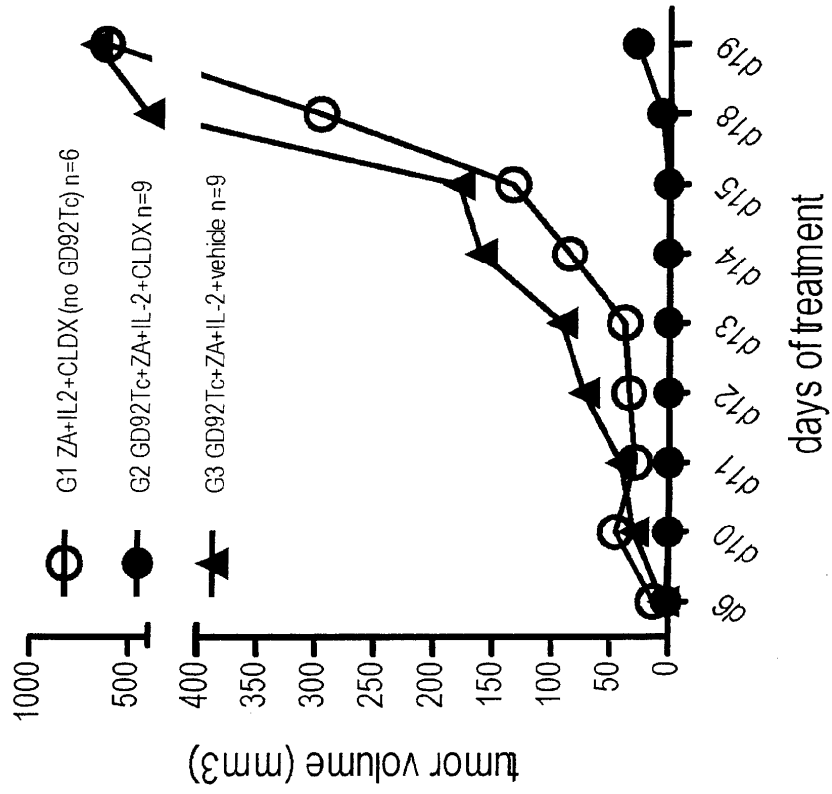


Figure 25

29/29

Figure 26

