

CONSTRUCTOS DE ANTICUERPOS PARA CLDN18.2 Y CD3

La presente invención se refiere a un constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a claudina 18.2 (CLDN18.2) y otro dominio que se une a CD3. Además, la invención proporciona un polinucleótido que codifica para el constructo de anticuerpo, un vector que comprende dicho polinucleótido y una célula huésped transformada o transfectada con dicho polinucleótido o vector. Además, la invención proporciona un procedimiento para producir el constructo de anticuerpo de la invención, un uso médico de dicho constructo de anticuerpo y un kit que comprende dicho constructo de anticuerpo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las claudinas son componentes funcionales y estructurales clave de uniones epiteliales estrechas, que actúan regulando la permeabilidad célula a célula, mantienen la homeostasis iónica y soportan la polaridad y adhesión celulares. Las claudinas son proteínas transmembrana que atraviesan cuatro veces la membrana de 22-27 kDa que se multimerizan dentro de o atraviesan las membranas celulares formando una barrera protectora. Las 24 proteínas claudina que se han notificado difieren en la especificidad de su ubicación tisular y en sus interacciones con otras proteínas.

La claudina 18 (CLDN18) se identificó inicialmente como gen diana para el factor de transcripción T/EBP/NKX2.1. Consecuente con su homología con otros miembros de la familia de claudina, se confirmó que CLDN18 se localiza en uniones celulares estrechas en ratón y ser humano. Se mostró que CLDN18 codifica para dos isoformas generadas mediante corte y empalme alternativo: CLDN18.1, expresada específicamente en pulmón normal, y CLDN18.2, expresada en células diferenciadas de la mucosa gástrica.

CLDN18.2 es una proteína de 261 aminoácidos con dos bucles extracelulares, y tiene el 92% de identidad de secuencia con CLDN18.1. A diferencia del segundo bucle extracelular, el primer bucle extracelular de CLDN18.2 tiene diferencias de ocho aminoácidos de CLDN18.1. La homología de CLDN18.2 con otros miembros de la familia es más limitada, con el 29-34% de identidad global con CLDN1, CLDN6 y CLDN7.

CLDN18.2 se expresa en varios tipos de tumor, incluyendo cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de ovario mucinoso y cáncer de pulmón de células no pequeñas. La expresión de CLDN18.2 en cáncer gástrico incluye los sitios metastásico y frontal invasivo, aunque se notifica que los niveles absolutos de CLDN18 disminuyen en estos entornos. La expresión de CLDN18.2 en múltiples tipos de tumor, con la expresión tisular normal restringida principalmente a células diferenciadas en el estómago, ha conducido a la consideración de CLDN18.2 como diana terapéutica en cáncer gástrico y otras indicaciones.

Los cánceres gástrico y gastroesofágico siguen siendo indicaciones con una alta necesidad médica no satisfecha, con al menos 1.4 millones de nuevos casos y 1.1 millones de muertes notificados anualmente en todo el mundo (Lordick y Janjigian, Nat Rev Cancer 2016).

El tratamiento de primera línea típico implica cirugía y quimioterapia de combinación que incluye compuestos de platino y fluoropirimidina. Aunque este régimen puede mejorar potencialmente la calidad de vida y prolongar la supervivencia una mediana de 8-10 meses, las tasas de supervivencia a los 5 años siguen siendo bajas.

5 Las terapias dirigidas ofrecen una estrategia alternativa para el tratamiento. El anticuerpo monoclonal anti-Her2 monoclonal está aprobado para el tratamiento de primera línea de cáncer gástrico y gastroesofágico positivo para Her2, en combinación con quimioterapia (Bang et al., The Lancet 2010). El anticuerpo anti-VEGFR2 ramucirumab está aprobado para el tratamiento de cáncer gástrico y gastroesofágico que ha progresado tras la
10 quimioterapia (Fuchs et al., The Lancet 2014). Aunque estos agentes dirigidos aumentan además la supervivencia en comparación con la quimioterapia sola, su eficacia se ha limitado por la heterogeneidad de expresión de dianas y por mecanismos de resistencia.

Más recientemente, la terapia de puntos de control inmunitarios ha demostrado actividad en entornos selectos: pembrolizumab se aprobó en los Estados Unidos para el
15 tratamiento de tumores microsatélites de alta inestabilidad (MSI-H), incluyendo cáncer gástrico (Le et al., Science 2017), y para el tratamiento de cáncer gástrico avanzado no resecable o recurrente que progresó tras dos o más líneas de quimioterapia (Fuchs et al., J Clin Oncol 2017). Nivolumab se aprobó en Japón para el tratamiento de cáncer gástrico avanzado no resecable o recurrente que progresó tras la quimioterapia (Kang et al., The Lancet, 2017). Sólo
20 el 1-2% de pacientes en poblaciones no seleccionadas, y el 60% de la población con MSI-H (microsatélite de alta inestabilidad) (el 9% de los casos gástricos y gastroesofágicos totales) demostraron una respuesta completa en estos estudios. Se necesitan todavía por tanto nuevas terapias con el potencial de proporcionar una respuesta duradera a una mayor población de pacientes.

25 El cáncer pancreático ha demostrado ser incluye menos sensible a la terapia disponible que los cánceres gástrico o gastroesofágico. Hay al menos 338,000 casos y 331,000 muertes de cáncer pancreático notificados en todo el mundo anualmente, con una mediana de supervivencia de 6 meses (Ilic y Ilic, World J Gastroenterol 2016). Tan sólo el 20-30% de los pacientes son candidatos para la resección quirúrgica. La gemcitabina se ha considerado
30 terapia de primera línea hasta recientemente, cuando se mostró que los regímenes de terapia de combinación FOLFIRINOX (5-fluorouracilo, leucovorina, oxaliplatino, irinotecán) y gemcitabina con nab-paclitaxel, aumentan la supervivencia global ~2-5 meses son respecto al tratamiento con gemcitabina sola (Uccello et al., Curr Oncol 2018). Otras combinaciones de quimioterapia se usan normalmente en la terapia de segunda línea. Varios agentes de
35 inmunoterapia y de terapia dirigida se han evaluado en cáncer pancreático avanzado con éxito limitado. Los tumores pancreáticos se caracterizan por desmoplasia e infiltrados inmunitarios

inmunosupresores que dirigen esta falta de respuesta. Se necesitan nuevas terapias con potencial para superar este entorno inmunosupresor y prolongar la supervivencia.

Constructos de anticuerpos biespecíficos que comprenden un dominio que se une a CD3 en una célula T y un dominio que se une a una proteína expresada en una célula diana conectan directamente las células T con la células diana para inducir lisis redirigida por células T. Este mecanismo de acción es distinto de la quimioterapia, terapia dirigida y otra inmunoterapia porque puede funcionar con cualquier célula T positiva para CD3, independiente de una señal de activación coestimuladora (Klinger et al., Immunol Reviews 2016). La expresión de CLDN18.2 en la superficie celular de cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico y cáncer pancreático proporciona una base para seleccionar como diana estos tipos de tumores con un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2 x CD3. Además, un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2 x CD3 tiene el potencial de seleccionar como diana tipos de tumores adicionales que expresan CLDN18.2, incluyendo cáncer de ovario mucinoso, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Por tanto, es un aspecto, la presente invención proporciona un constructo de anticuerpo que comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T.

También se prevé que:

(1) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une al primer bucle extracelular (bucle 1) de CLDN18.2;

(2) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une al mismo epítipo de CLDN18.2 que un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140;

(3) el constructo de anticuerpo de la invención compite por la unión con un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140;

(4) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 22, y opcionalmente también se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 24, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 23;

(5) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 14 y/o a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 15, y opcionalmente también se une a uno o más mutantes de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en SEQ ID NO: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 y 21, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 18;

(6) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana, en el que Glu (E) en la posición 56 de

CLDN18.2 humana es esencial para la unión del primer dominio, y Ala (A) en la posición 42 y/o Asn (N) en la posición 45 de CLDN18.2 humana es/son esencial(es) para la unión del primer dominio; y/o

(7) el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un epítipo de CLDN18.2 que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 266, pero que no comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 265, y opcionalmente también que no comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 267.

Ventajosamente, la selección como diana del epítipo de CLDN18.2 que reconocen los constructos de anticuerpos de la presente invención (véase también el ejemplo 2) proporciona los siguientes beneficios:

(1) selectividad de los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 con respecto a CLDN18.1 (véase el ejemplo 6), y

(2) una potencia citotóxica inesperadamente alta para los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 (véase el ejemplo 7.4).

El término "constructo de anticuerpo" se refiere a una molécula en la que la estructura y/o función se basa(n) en la estructura y/o función de un anticuerpo, por ejemplo, de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa. Un constructo de anticuerpo por tanto se une inmunoespecíficamente a su diana o antígeno, y/o comprende la región variable de cadena pesada (VH) y/o la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo, o comprende dominios derivados de las mismas. Un constructo de anticuerpo según la invención comprende los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permiten la unión a la diana inmunoespecífica. Este requisito mínimo puede definirse, p. ej., por la presencia de al menos tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH), preferentemente de las seis CDR. Un constructo de anticuerpo puede caracterizarse por tanto por la presencia de tres o seis CDR en o bien uno o bien ambos dominios de unión, y el experto conoce dónde (en qué orden) esas CDR se ubican dentro del dominio de unión.

La definición de "anticuerpo" según la invención comprende anticuerpos de longitud completa, incluyendo también anticuerpos de camélidos y otras inmunoglobulinas generadas mediante procesos o métodos biotecnológicos o de modificación por ingeniería genética de proteínas. Estos anticuerpos de longitud completa puede ser por ejemplo anticuerpos monoclonales, recombinantes, quiméricos, desinmunizados, humanizados y humanos, así como anticuerpos de otras especies tales como ratón, hámster, conejo, rata, cabra o primates no humanos.

"Constructos de anticuerpos" de la presente invención pueden tener la estructura de una inmunoglobulina de longitud completa tal como se produce de manera natural. Por

ejemplo, pueden comprender (al menos) dos cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa y dos cadenas ligeras de anticuerpo de longitud completa. Sin embargo, dado que los constructos de anticuerpos según la invención comprenden un dominio que se une a CLDN18.2 y otro dominio que se une a CD3, no se producen de manera natural, y son

5 marcadamente diferentes en su función de productos que se producen de manera natural. Un constructo de anticuerpo de la invención es por tanto una molécula "híbrida" artificial que comprende al menos dos dominios de unión distintos con diferentes especificidades.

Los "constructos de anticuerpos" de la presente invención pueden comprender también fragmentos de anticuerpos de longitud completa, tales como VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, cadena ligera (VL-CL), Fd (VH-CH1), cadena pesada, Fab, Fab', F(ab')₂ o "r IgG" ("semianticuerpo" que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera). Los constructos de anticuerpos según la invención pueden comprender también fragmentos de anticuerpos modificados, también denominados variantes de anticuerpos o derivados de anticuerpos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, scFv, di-scFv o bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-cremallera, scFab, Fab₂, Fab₃, diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla, diacuerpos en tándem (Tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, "minicuerpos" ejemplificados por una estructura que es tal como sigue: (VH-VL-CH3)₂, (scFv-CH3)₂, ((scFv)₂-CH3 + CH3), ((scFv)₂-CH3) o (scFv-CH3-scFv)₂, multicuerpos tales como triacuerpos o tetracuerpos, y anticuerpos de un solo dominio tales como nanocuerpos o anticuerpos de un solo dominio variable que comprenden meramente una región variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se une específicamente aun antígeno o diana independientemente de otros dominios o regiones variables. Posibles formatos adicionales de los constructos de anticuerpos según la invención son cuerpos cruzados, maxicuerpos, heteroconstructos de Fc, monoconstructos de Fc y constructos de scFc. A continuación se describirán en la presente ejemplos para esos

10 15 20 25

Además, la definición del término "constructo de anticuerpo" incluye constructos bivalentes y polivalentes / multivalentes así como constructos biespecíficos y poliespecíficos / multiespecíficos, que se unen específicamente a dos, tres o más estructuras antigénicas, a través de dominios de unión distintos. Un constructo de anticuerpo puede tener más valencias de unión que especificidades, por ejemplo en un caso en el que tiene dos dominios de unión para la primera diana (Cldn18.2) y un dominio de unión para la segunda diana (CD3), o viceversa, en cuyo caso el constructo es trivalente y biespecífico. En general, el término "biespecífico" incluye el significado de que un constructo de anticuerpo se une a (al menos) dos antígenos diferentes, tales como Cldn18.2 y CD3.

30

Además, la definición del término "construcción de anticuerpos" incluye moléculas que consisten en solo una cadena polipeptídica, así como moléculas que consisten en dos, tres, cuatro o más cadenas polipeptídicas, cadenas que pueden ser idénticas (homodímeros,

35

homotrómeros u homo oligómeros) o diferentes (heterodímero, heterotrómero o heterooligómero). Se describen ejemplos para los anticuerpos identificados anteriormente y sus fragmentos, variantes, derivados y constructos de anticuerpos derivados de los mismos entre otros en Harlow y Lane, *Antibodies: A laboratory manual*, CSHL Press (1988); Kontermann y Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2ª ed. 2010; y Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

El término "dominio de unión" o "dominio que se une a..." caracteriza en relación con la presente invención un dominio del constructo de anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a / interacciona con / reconoce un epítipo en la diana o antígeno (en este caso: CLDN18.2 en el caso del primer dominio, y CD3 en el caso del segundo dominio). La estructura y función del primer dominio (que se une a CLDN18.2), y preferiblemente también la estructura y/o función del segundo dominio (que se une a CD3), se basa(n) en la estructura y/o función de un anticuerpo, por ejemplo de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa. El "dominio de unión" o "dominio que se une a..." puede comprender por tanto los requisitos estructurales mínimos de un anticuerpo que permite la unión a la diana inmunoespecífica. Este requisito estructural mínimo del primer dominio puede definirse por ejemplo por la presencia de al menos tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o de tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH), preferiblemente de las seis CDR. Se prevé que el segundo dominio también comprenda este requisito estructural mínimo de un anticuerpo que permite la unión a la diana inmunoespecífica. Más preferiblemente, el segundo dominio también comprende al menos tres CDR de cadena ligera (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VL) y/o tres CDR de cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y CDR3 de la región VH), preferiblemente las seis CDR. Un "dominio que se une a" (o un "dominio de unión") puede comprender normalmente una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH); sin embargo, no comprende ambas, pero puede comprender una sola de VH o VL. Los fragmentos Fd, por ejemplo, retienen a menudo alguna función de unión a antígeno del dominio de unión a antígeno intacto.

Los ejemplos del formato de un "dominio que se une a" (o un "dominio de unión") incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de longitud completa (tales como VH, VHH, VL), (s)dAb, Fv, cadena ligera (VL-CL), Fd (VH-CH1), cadena pesada, Fab, Fab', F(ab')₂ o "r IgG" ("semianticuerpo"), variantes o derivados de anticuerpos tales como scFv, di-scFv o bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-cremallera, scFab, Fab₂, Fab₃, diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla, diacuerpos en tándem (Tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, „minicuerpos" (seleccionados de formatos tales como (VH-VL-CH3)₂, (scFv-CH3)₂, ((scFv)₂-CH3 + CH3), ((scFv)₂-CH3) o (scFv-CH3-scFv)₂, multicuerpos tales como triacuerpos o tetracuerpos, y anticuerpos de un solo dominio tales como

nanocuerpos o anticuerpos de un solo dominio variable que comprenden meramente una región variable, que podrían ser VHH, VH o VL. Los ejemplos adicionales para el formato de un "dominio que se une a" (o un "dominio de unión") incluyen (1) un fragmento o variante de anticuerpo que comprende VL, VH, CL y CH1 (tal como Fab); (2) un fragmento o variante de anticuerpo que comprende dos fragmentos Fab unidos (tal como un F(ab')₂); (3) un fragmento o variante de anticuerpo que comprende VH y CH₁ (tal como Fd); (4) un fragmento o variante de anticuerpo que comprende VL y CL (tal como la cadena ligera); (5) un fragmento o variante de anticuerpo que comprende VL y VH (tal como Fv); (5) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341 :544-546), que tiene un dominio VH; (6) una variante de anticuerpo que comprende al menos tres CDR aisladas de la cadena pesada y/o ligera; y (7) un Fv de cadena sencilla (scFv). Se describen ejemplos de realizaciones de constructos de anticuerpos o fragmentos de unión según la invención, por ejemplo en los documentos WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 y WO 2015/048272.

Se prevé para el constructo de anticuerpo de la presente invención que

- a) el constructo de anticuerpo es un polipéptido de cadena sencilla o un constructo de anticuerpo de cadena sencilla,
- b) el primer dominio está en el formato de un scFv,
- c) el segundo dominio está en el formato de un scFv,
- d) el primero y el segundo dominio se conectan por medio de un ligador, preferiblemente un ligador peptídico, más preferiblemente un ligador de glicina/serina, y/o
- e) el constructo de anticuerpo comprende un dominio que proporciona una semivida sérica prolongada, tal como un dominio basado en Fc.

Los constructos de anticuerpos de la presente invención son preferiblemente "constructos de anticuerpos generados *in vitro*" y/o "constructos de anticuerpos recombinantes". En el contexto de la presente invención, el término "generado *in vitro*" se refiere a un constructo de anticuerpo según la definición anterior en el que todo o parte del dominio de unión o de una región variable (por ejemplo, al menos una CDR) se genera en una selección en células no inmunitarias, por ejemplo, en un ensayo e presentación en fago *in vitro*, en un chip proteico o en cualquier otro método en el que las secuencias de aminoácidos candidatas pueden someterse a prueba para determinar su capacidad para unirse a un antígeno. Por lo tanto, esta expresión preferentemente excluye secuencias generadas solamente por reordenamiento genómico en una célula inmune en un animal. Se prevé que el primer y/o segundo dominio del constructo de anticuerpo se produzca por o pueda obtenerse mediante métodos de presentación en fago o examen de bibliotecas en vez de injertando secuencias de CDR a partir de un anticuerpo preexistente (monoclonal) en un armazón. Un

"constructo de anticuerpo recombinante" es un constructo de anticuerpo generado o producido usando (entre otros) tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética.

Los constructos de anticuerpos de la presente invención se prevé que sean monoclonales. Tal como se usan en la presente, los anticuerpos o constructos de anticuerpos que se denominan "monoclonales" (mAb) se obtienen a partir de una población de anticuerpos / constructos de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos / constructos de anticuerpos individuales comprendidos en la población son idénticos (en particular con respecto a su secuencia de aminoácidos) excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales / constructos de anticuerpos son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítipo dentro del antígeno, en contraposición a preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (o epítopos). Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque los sintetiza el cultivo de hibridomas y por lo tanto no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo / constructo de anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se utilizarán pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Koehler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos del ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 4,816,567). Algunos ejemplos de otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanos incluyen la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Después, se pueden detectar los hibridomas mediante el uso de métodos estándar, como el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón superficial (BIAcore™), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno específico. Cualquier forma del antígeno pertinente se puede utilizar como el inmunógeno, p. ej., un antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmento de estos, así como un péptido antigénico de estos. La resonancia de plasmón superficial tal como se emplea en el sistema BIAcore™ puede utilizarse para aumentar la eficacia de anticuerpos / constructos de

anticuerpos en fagos que se unen a un epítipo de un antígeno diana (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Otro método a modo de ejemplo de preparación de constructos de anticuerpos o dominios de unión incluye examinar bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de presentación en fago o de presentación en ribosoma. La expresión en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner et al., la patente de Estados Unidos N.º 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991).

Además del uso de las bibliotecas de expresión, el antígeno pertinente se puede utilizar para inmunizar un animal no humano, p. ej., un roedor (como un ratón, un hámster, un conejo o una rata). En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humano. Por ejemplo, se pueden modificar genéticamente cepas de ratón con déficit de producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig (inmunoglobulina) humana. Al utilizar la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, Xenomouse™, Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21, los documentos US 2003-0070185, WO 96/34096 y WO 96/33735.

Un anticuerpo monoclonal también se puede obtener de un animal no humano y después modificar, p. ej., humanizar, desinmunizar, volver quimérico, etc., utilizando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Los ejemplos de constructos de anticuerpos o dominios de unión modificados incluyen variantes humanizadas de anticuerpos / constructos de anticuerpos no humanos, constructos de anticuerpos o dominios de unión “madurados por afinidad” (véanse, por ejemplo Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) y Lowman et al., Biochemistry 30, 10832- 10837 (1991)) y variantes o mutantes de anticuerpos con función/funciones efectora(s) alterada(s) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5,648,260, Kontermann y Dübel (2010), *loc. cit.* y Little (2009), *loc. cit.*).

En inmunología, la maduración por afinidad es el proceso por el cual los linfocitos B producen anticuerpos con mayor afinidad por los antígenos durante el transcurso de una respuesta inmunitaria. Con las exposiciones reiteradas al mismo antígeno, un huésped producirá anticuerpos con afinidades cada vez mayores. Al igual que el prototipo natural, la maduración por afinidad *in vitro* se basa en los principios de la mutación y la selección. La maduración por afinidad *in vitro* se ha usado satisfactoriamente para optimizar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos, constructos de anticuerpos o dominios de unión. Las mutaciones aleatorias dentro de las CDR se introducen utilizando radiación, mutágenos químicos o PCR propensa a errores. Además, la diversidad genética se puede aumentar mediante transposición de cadena. Dos o tres rondas de mutación y selección usando métodos de presentación como presentación en fago habitualmente dan como

resultado anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpos, constructos de anticuerpos o dominios de unión con afinidades en el intervalo nanomolar bajo.

Un tipo preferido de variación de sustitución de aminoácidos de los constructos de anticuerpos o dominios de unión de la invención implica sustituir uno o más residuos dentro de la región hipervariable de una estructura de anticuerpo original (por ejemplo una estructura de anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la variante o variantes resultante(s) seleccionadas para un desarrollo adicional tendrán mejores propiedades biológicas en comparación con la estructura de anticuerpo original a partir del cual se generan. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución implica la maduración por afinidad con una expresión en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes generadas de esta forma se expresan de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 envuelto dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fago se examinan entonces para determinar su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) tal como se da a conocer en la presente. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos que contribuyen significativamente a la unión al antígeno (candidatos para la modificación), también puede realizarse mutagénesis por barrido de alaninas. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo entre el antígeno y el constructo de anticuerpo o el dominio de unión para identificar puntos de contacto entre el dominio de unión y su antígeno específico. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas tratadas en el presente documento. Una vez generadas tales variantes, el panel de variantes se somete a examen tal como se describe en la presente y pueden seleccionarse anticuerpos, sus fragmentos de unión a antígeno, constructos de anticuerpos o dominios de unión con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para su desarrollo adicional.

Los constructos de anticuerpos y dominios de unión de la presente invención incluyen específicamente versiones "quiméricas" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la o las cadenas es/son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos o variantes de dichos anticuerpos, con la condición de que presenten la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos N.º 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los constructos de anticuerpos quiméricos o dominios de unión de interés en la presente incluyen constructos de anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas

de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humana. Se han descrito una variedad de enfoques para preparar anticuerpos quiméricos o constructos de anticuerpos. Véanse *por ejemplo*, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda *et al.*, Nature 314:452, 1985, Cabilly *et al.*, patente estadounidense número 4,816,567; Boss *et al.*, patente estadounidense número 4,816,397; Tanaguchi *et al.*, documentos EP 0171496; EP 0173494; y GB 2177096.

Un anticuerpo, constructo de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, variante de anticuerpo o dominio de unión puede modificarse también mediante delección específica de epítomos de células T humanas (un método denominado "desinmunización") usando métodos dados a conocer por ejemplo en los documentos WO 98/52976 o WO 00/34317. Brevemente, las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo, constructo de anticuerpo o dominio de unión pueden analizarse para detectar péptidos que se unen a MHC de clase II; estos péptidos representan posibles epítomos de células T (tal como se definen por ejemplo en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de posibles epítomos de linfocitos T, se puede aplicar un enfoque de modelo informático llamado "reconocimiento de plegamiento de péptidos" y además se puede buscar en una base de datos de péptidos de unión a MHC clase II humano para obtener motivos presentes en las secuencias VH y VL, como se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos DR principales de MHC clase II, y, por lo tanto, constituyen posibles epítomos de linfocitos T. Se pueden eliminar los posibles epítomos de linfocitos T detectados a través de la sustitución de pequeñas cantidades de residuos de aminoácidos en los dominios variables o las regiones variables, o preferentemente, a través de sustituciones de un único aminoácido. Típicamente, se realizan sustituciones conservadoras. A menudo, pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común a una posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana se describen, p. ej., en Tomlinson, *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. *et al.* (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; y Tomlinson *et al.* (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. El directorio V BASE (www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php) proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas (reunido por Tomlinson, LA. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, RU). Estas secuencias se pueden utilizar como una fuente de secuencia humana, p. ej., para las regiones marco y las CDR. Las regiones marco humanas de consenso también se pueden utilizar, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6,300,064.

Los anticuerpos "humanizados", variantes o fragmentos de los mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión se basan en inmunoglobulinas de principalmente secuencias humanas, que contienen (a) secuencia(s) mínima(s) derivada(s) de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados, variantes o fragmentos de los

mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión se basan en inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que residuos de una región hipervariable o CDR se reemplazan por residuos de una región hipervariable o CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como un roedor (por ejemplo ratón, hámster, rata o conejo) que tiene la especificidad, afinidad, capacidad y/o actividad biológica deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos "humanizados", variantes o fragmentos de los mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión tal como se usan en la presente pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Los anticuerpos humanizados, variantes o fragmentos de los mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión pueden comprender también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (tal como Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para consultar más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992).

Pueden generarse anticuerpos humanizados, variantes o fragmento de los mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión reemplazando secuencias de la región variable (Fv) que no están implicados directamente en la unión al antígeno con secuencias equivalentes a partir de regiones variables humanas (Fv). Se proporcionan métodos a modo de ejemplo para generar tales moléculas por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4:214; y por los documentos US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; y US 6,407,213. Estos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifica para todas o parte de las regiones variables de inmunoglobulina (Fv) a partir de al menos una de una cadena pesada o ligera. Tales ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, tal como se describió anteriormente, así como a partir de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica para el anticuerpo humanizado, variante o fragmento del mismo, constructo de anticuerpo o dominio de unión puede entonces clonarse en un vector de expresión adecuado.

Los anticuerpos humanizados, variantes o fragmentos de los mismos, constructos de anticuerpos y dominios de unión también pueden producirse utilizando animales transgénicos como ratones que expresan genes de cadena ligera y pesada humanos, pero son incapaces de expresar los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón endógenos. Winter describe un método de injerto de CDR ejemplar que se puede utilizar para preparar las moléculas humanizadas descritas en el presente documento (patente de Estados Unidos N.º 5,225,539). Es posible reemplazar todas las CDR de una secuencia humana particular por al

menos una parte de una CDR no humana o solamente es posible reemplazar algunas de las CDR por CDR no humanas. Solo es necesario reemplazar la cantidad de CDR necesarias para unir la molécula humanizada con un antígeno predeterminado.

5 Un anticuerpo humanizado, variante o fragmento del mismo, constructo de anticuerpo o dominio de unión puede optimizarse mediante la introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas se pueden elaborar mediante cualquiera de las varias técnicas conocidas en la técnica (p. ej., Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4: 7279, 1983; 10 Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, y EP 239 400).

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos / constructos de anticuerpos quiméricos o humanizados de otra forma. Sin embargo, se espera que se observen determinadas respuestas anti-anticuerpo quimérico humano (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiples dosis de 15 un anticuerpo o constructo de anticuerpo. Por tanto, sería deseable proporcionar constructos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión humano contra CLDN18.2 y/o un dominio de unión humano contra CD3, con el fin de evitar problemas y/o efectos de respuesta de HAMA o HACA.

Por tanto, según una realización, el constructo de anticuerpo, el primer dominio de 20 unión y/o el segundo dominio de unión son "humanos". Las expresiones "anticuerpo humano", "constructo de anticuerpo humano" y "dominio de unión humano" incluyen anticuerpos, constructos de anticuerpos y dominios de unión, respectivamente, que tienen regiones de anticuerpos tales como regiones o dominios variables y constantes que corresponden sustancialmente a las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas en 25 la técnica, lo que incluye, por ejemplo, las descritas por Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Los constructos de anticuerpos humanos o dominios de unión de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por la mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y 30 en particular, en la CDR3. Los constructos de anticuerpos humanos o dominios de unión pueden tener al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas con un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. La definición de anticuerpos humanos, constructos de anticuerpos y dominios de unión, tal como se utilizan en la presente, también contemplan anticuerpos 35 completamente humanos, constructos de anticuerpos y dominios de unión que incluyen solamente secuencias humanas no artificiales y/o alteradas genéticamente de anticuerpos ya que aquellas pueden obtenerse al utilizar tecnologías o sistemas tales como Xenomouse.

Los constructos de anticuerpos que comprenden al menos un dominio de unión humano evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos o los constructos de anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes no humanas tal como de roedor (por ejemplo, murino, rata, hámster o conejo). La presencia de tales proteínas derivadas de roedor puede conducir a una rápida eliminación de los anticuerpos o los constructos de anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo o la construcción de anticuerpos en un paciente. Para evitar el uso de constructos de anticuerpos derivados de roedor, pueden generarse constructos de anticuerpos humanizados o completamente humanos a través de la introducción de una función de anticuerpo humano en un roedor de modo que el roedor produce anticuerpos completamente humanos.

La capacidad de clonar y reconstruir loci humanos de tamaño de megabases en YAC y de introducirlos en la línea germinal de ratón proporciona un enfoque potente para dilucidar los componentes funcionales loci muy grandes o mapeados de forma bruta, así como generar modelos útiles de enfermedad humana. Además, la utilización de dicha tecnología para la sustitución de loci de ratón con sus equivalentes humanos podría proporcionar conocimientos únicos para la expresión y la regulación de productos genéticos humanos durante el desarrollo, su comunicación con otros sistemas y su participación en la inducción y el avance de enfermedades.

Una aplicación práctica importante de tal estrategia es la "humanización" del sistema inmunitario humoral del ratón. La introducción de loci de inmunoglobulina humana (Ig) en los ratones en los cuales los genes de Ig endógenos se han inactivado ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos subyacentes a la expresión programada y el ensamblaje de anticuerpos, así como su función en el desarrollo de linfocitos B. Además, dicha estrategia puede proporcionar una fuente ideal para la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos (mAb), un hito importante hacia el cumplimiento de la promesa del tratamiento con anticuerpos en las enfermedades humanas. Se espera que los anticuerpos completamente humanos o los constructos de anticuerpos derivados de los mismos reduzcan al mínimo las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a mAb de ratón o derivados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y seguridad de los anticuerpos/constructos de anticuerpos administrados. Se puede esperar que el uso de anticuerpos completamente humanos o constructos de anticuerpos proporcione una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer, que requieren administraciones repetidas del compuesto.

Un enfoque hacia esta meta fue la modificación genética de cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes del loci de Ig humana con la expectativa de que dichos ratones produjeran un repertorio amplio de anticuerpos humanos ante la ausencia de los anticuerpos de ratón. Los fragmentos grandes de Ig humana

conservarían la gran diversidad genética variable así como la regulación adecuada de la producción y expresión de anticuerpos. Al aprovechar la capacidad del ratón para la diversificación y la selección de anticuerpos y la falta de tolerancia inmunológica a las proteínas humanas, el repertorio de anticuerpos humanos reproducidos en esas cepas de ratón debe producir anticuerpos con alta afinidad contra cualquier antígeno de interés, incluido antígenos humanos. Utilizando la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionar fácilmente mAb humanos específicos de antígenos con la especificidad deseada. Esta estrategia general fue demostrada con relación a la generación de las primeras cepas de ratón XenoMouse (véase Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Las cepas XenoMouse se modificaron genéticamente con cromosomas artificiales de levadura (YAC) que contenían fragmentos de configuración de línea germinal de 245 kb y 190 kb de tamaño del locus de cadena pesada humana y el locus de cadena ligera kappa, respectivamente, que contenían secuencias de región variable y constante nucleares. Los YAC que contenían Ig humana resultaron compatibles con el sistema de ratón para el reordenamiento y la expresión de los anticuerpos y fueron capaces de sustituirse por los genes de Ig de ratón inactivados. Esto se demostró por su capacidad de inducir el desarrollo de linfocitos B, producir un repertorio humano tipo adulto de anticuerpos completamente humanos y generar mAb humanos específicos de antígeno. Estos resultados también sugirieron que la introducción de partes más grandes del loci de Ig humana que contenían mayores cantidades de genes V, elementos reguladores adicionales y regiones constantes de Ig humana podría recapitular sustancialmente el repertorio completo que es característico de la respuesta humoral humana a la infección y la inmunización. El trabajo de Green et al. se amplió a la introducción de más de aproximadamente el 80 % del repertorio de anticuerpos humanos a través de la introducción de fragmentos YAC de configuración de línea germinal, de tamaño de megabases de loci de cadena pesada humana y loci de cadena ligera kappa, respectivamente. Véanse Mendez *et al.* *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y la solicitud de patente estadounidense con número de serie n.º de serie 08/759,620.

La producción del modelo XenoMouse se discute adicionalmente y se define en las solicitudes de patente de Estados Unidos con n.º de serie 07/466,008, n.º de serie 07/610,515, n.º de serie 07/919,297, n.º de serie 07/922,649, n.º de serie 08/031,801, n.º de serie 08/112,848, n.º de serie 08/234,145, n.º de serie 08/376,279, n.º de serie 08/430,938, n.º de serie 08/464,584, n.º de serie 08/464,582, n.º de serie 08/463,191, n.º de serie 08/462,837, n.º de serie 08/486,853, n.º de serie 08/486,857, n.º de serie 08/486,859, n.º de serie 08/462,513, n.º de serie 08/724,752, y n.º de serie 08/759,620; y las patentes estadounidenses número 6,162,963; 6,150,584; 6,114,598; 6,075,181 y 5,939,598 y las patentes japonesas número 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véanse también Mendez *et al.* *Nature Genetics*

15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), los documentos EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y WO 03/47336.

En un enfoque alternativo, otros, incluido GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, se imita un locus Ig exógeno por medio de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus Ig. Por lo tanto, uno o más genes VH, uno o más genes DH, uno o más genes JH, una región constante mu, y una segunda región constante (de preferencia, una región constante gamma) se forman en una construcción para insertar en un animal. Este enfoque se describe en la patente estadounidense número 5,545,807 concedida a Surani *et al.* y las patentes estadounidenses número 5,545,806; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; 5,770,429; 5,789,650; 5,814,318; 5,877,397; 5,874,299; y 6,255,458 cada una concedida a Lonberg y Kay, las patentes estadounidenses número 5,591,669 y 6,023,010 concedidas a Krimpenfort y Berns, las patentes estadounidenses número 5,612,205; 5,721,367; y 5,789,215 concedidas a Berns *et al.*, y la patente estadounidense número 5,643,763 concedida a Choi y Dunn, y la solicitud de patente estadounidense de GenPharm con n.º de serie 07/574,748, n.º de serie 07/575,962, n.º de serie 07/810,279, n.º de serie 07/853,408, n.º de serie 07/904,068, n.º de serie 07/990,860, n.º de serie 08/053,131, n.º de serie 08/096,762, n.º de serie 08/155,301, n.º de serie 08/161,739, n.º de serie 08/165,699, n.º de serie 08/209,741. Véanse también los documentos EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y la patente estadounidense número 5,981,175. Véase además Taylor *et al.* (1992), Chen *et al.* (1993), Tuailon *et al.* (1993), Choi *et al.* (1993), Lonberg *et al.* (1994), Taylor *et al.* (1994), y Tuailon *et al.* (1995), Fishwild *et al.* (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los cuales, por medio de fusión de microcélulas, se introdujeron grandes porciones de cromosomas o cromosomas enteros. Véanse las solicitudes de patentes europeas número 773 288 y 843 961. Xenerex Biosciences está desarrollando una tecnología para la posible generación de anticuerpos humanos. En esta tecnología, se reconstituyen ratones SCID con células linfáticas humanas, por ejemplo, células B y/o T. Los ratones se inmunizan con un antígeno y pueden generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno. Véanse las patentes estadounidenses números 5,476,996; 5,698,767; y 5,958,765.

En algunas realizaciones, los constructos de anticuerpos de la invención son constructos de anticuerpos "aislados" o "sustancialmente puros". "Aislado" o "sustancialmente puro", cuando se utiliza para describir los constructos de anticuerpos descritos en el presente documento, significa una construcción de anticuerpos que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferentemente, la construcción de anticuerpos se encuentra libre o sustancialmente libre de asociación con todos los demás

componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que podrían interferir con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el constructo de anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormas y otros compuestos proteínicos o no proteínicos.

5 Se entiende que el constructo de anticuerpo aislado o sustancialmente puro puede constituir de desde el 5% hasta el 99.9% en peso del contenido en proteína / polipéptido total en una muestra dada, dependiendo de las circunstancias. El constructo de anticuerpo deseado puede producirse a una concentración significativamente superior a través del uso de un promotor inducible o promotor de alta expresión. La definición incluye la producción de una construcción
10 de anticuerpos en una amplia variedad de organismos y/o células huésped conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, el constructo de anticuerpo se purificará (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie
15 o, preferiblemente, tinción con plata. Habitualmente, sin embargo, se preparará un constructo de anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Según una realización, todo el constructo de anticuerpo y/o los dominios de unión están en forma de uno o más polipéptidos o en forma de proteínas. Además de las partes proteínicas, tales polipéptidos o proteínas pueden incluir partes no proteínicas (por ejemplo
20 ligadores químicos o agentes de reticulación químicos tales como glutaraldehído).

Los péptidos son cadenas cortas de monómeros de aminoácido unidos por enlaces peptídicos (amida) covalentes. Por tanto, los péptidos se encuentran dentro de las clases químicas amplias de oligómeros y polímeros biológicos. Los aminoácidos que son parte de una cadena peptídica o polipeptídica se denominan "residuos" y pueden numerarse
25 consecutivamente. Todos los péptidos excepto los péptidos cíclicos tienen un residuo N-terminal en un extremo y un residuo C-terminal en el otro extremo del péptido. Un oligopéptido consiste en sólo unos pocos aminoácidos (habitualmente entre dos y veinte). Un polipéptido es una cadena peptídica más larga, continua y no ramificada. Los péptidos se distinguen de las proteínas basándose en el tamaño, y como parámetro arbitrario puede entenderse que
30 contiene aproximadamente 50 o menos aminoácidos. Las proteínas consisten en uno o más polipéptidos, habitualmente dispuestos de un modo biológicamente funcional. Aunque los aspectos de las técnicas de laboratorio aplicadas a péptidos frente a polipéptidos y proteínas difieren (por ejemplo, las características específicas de la electroforesis, cromatografía, etc.), los límites de tamaño que distinguen a los péptidos de los polipéptidos y las proteínas no son
35 absolutos. Por tanto, en el contexto de la presente invención, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" pueden usarse de manera intercambiable, y el término "polipéptido" se prefiere a menudo.

Los polipéptidos además pueden formar multímeros, tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, que consisten en más de una molécula de polipéptido. Las moléculas de polipéptidos que forman dichos dímeros, trímeros, etc., pueden ser idénticas o no idénticas. Las correspondientes estructuras de orden superior de tales multímeros se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Un ejemplo de un heteromultímero es un anticuerpo o molécula de inmunoglobulina que, en su forma que se produce de manera natural, consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" también se refieren a péptidos/polipéptidos/proteínas naturalmente modificados donde la modificación se logra, por ejemplo, mediante modificaciones postraduccionales como glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Un "péptido", un "polipéptido" o una "proteína", cuando se mencionan en el presente documento, también pueden estar químicamente modificados, por ejemplo, pegilados. Dichas modificaciones son conocidas en la técnica y se describen más adelante.

Los términos "se une a (específica o inmuno-específicamente)", "reconoce (específica o inmuno-específicamente)" o "reacciona con (específica o inmuno-específicamente)" significan según esta invención que un constructo de anticuerpo o un dominio de unión interacciona o interacciona (inmuno-)específicamente con un epítipo dado en la molécula diana (antígeno), en este caso: CLDN18.2 y CD3, respectivamente. Esta interacción o asociación se produce más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad o con alguna combinación de las mencionadas anteriormente, con un epítipo en la diana específica que con sustancias alternativas (moléculas no diana). Debido a la similitud de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, un constructo de anticuerpo o un dominio de unión que se une inmuno-específicamente a su diana (tal como una diana humana), sin embargo, puede reaccionar de manera cruzada con moléculas diana homólogas de diferentes especies (tal como, de primates no humanos). El término "unión específica / inmuno-específica" puede incluir por tanto la unión de un constructo de anticuerpo o dominio de unión a epítipos o epítipo relacionados estructuralmente en más de una especie.

En el contexto de la presente invención, el término "epítipo" se refiere a la parte o región del antígeno que reconoce / reconoce inmuno-específicamente el dominio de unión. Un "epítipo" es antigénico, y por tanto el término epítipo se denomina algunas veces "estructura antigénica" o "determinante antigénico". La parte del dominio de unión que se une al epítipo se denomina parátipo. Se cree que la unión específica se logra mediante motivos específicos en la secuencia de aminoácidos del dominio de unión y el antígeno. Por tanto, la unión se logra como resultado de su estructura primaria, secundaria y/o terciaria, así como el resultado de posibles modificaciones secundarias de dichas estructuras. La interacción específica del parátipo con su determinante antigénico puede dar como resultado una unión simple de dicho

sitio al antígeno. En algunos casos, la interacción específica puede dar como resultado alternativa o adicionalmente la iniciación de una señal, *por ejemplo* debido a la inducción de un cambio de la conformación del antígeno, una oligomerización del antígeno, etc.

Los epítomos de antígenos proteicos se dividen en dos categorías, epítomos conformacionales y epítomos lineales, basándose en su estructura e interacción con el parátomo. Un epítomo conformacional se compone de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos de antígeno. Estos epítomos interaccionan con el parátomo basándose en las características de superficie tridimensionales y la forma o estructura terciaria (plegamiento) del antígeno. Los métodos para determinar la conformación de los epítomos incluyen, entre otros, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (2D-NMR) y marcado de espín dirigido al sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR). En cambio, los epítomos lineales interaccionan con el parátomo basándose en su estructura primaria. Un epítomo lineal se forma mediante una secuencia continua de aminoácidos a partir del antígeno e incluye normalmente al menos 3 o al menos 4, y más habitualmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única.

Se describe un método de mapeo de epítomos de CLDN18.2 a continuación: Una región predefinida (un tramo de aminoácidos contiguos) dentro de los bucles extracelulares de la proteína CLDN18.2 humana se intercambia / se reemplaza con una región correspondiente de un parálogo de CLDN18.2 (tal como CLDN6 humana o CLDN9 humana, pero también son concebibles otros parálogos, siempre que el dominio de unión no reaccione de manera cruzada con el parálogo usado). Estas quimeras de parálogo / CLDN18.2 humana se expresan en la superficie de células huésped (tales como células CHO). La unión del anticuerpo o constructo de anticuerpo puede someterse a prueba por medio de análisis de FACS. Cuando la unión del anticuerpo o constructo de anticuerpo a la molécula quimérica se suprime totalmente, o cuando se observa una unión significativa, puede concluirse que la región de CLDN18.2 humana que se retiró de esta molécula quimérica es relevante para el reconocimiento inmuno específico de epítomo-parátomo. Dicha disminución en la unión es preferiblemente de al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, o 50%; más preferiblemente al menos el 60%, 70%, o 80%, y lo más preferiblemente el 90%, 95% o incluso el 100% en comparación con la unión a CLDN18.2 humana (tipo natural), mediante lo cual la unión a CLDN18.2 humana se establece que es del 100%. Alternativamente, el análisis de mapeo de epítomos descrito anteriormente puede modificarse introduciendo una o más mutaciones puntuales en la secuencia de CLDN18.2, específicamente la secuencia del bucle extracelular 1 o bucle 2. Estas mutaciones puntuales pueden reflejar por ejemplo las diferencias entre CLDN18.2 y su parálogo estrechamente relacionado CLDN18.1. Por ejemplo, las mutaciones pueden

seleccionarse del grupo que consiste en: Q29M, N37D, A42S, N45Q, Q47E, E56Q, G65P y L69I. Véanse los ejemplos 1 y 2.

Otro método para determinar la contribución de un residuo específico de un antígeno diana con el reconocimiento por una construcción de anticuerpos o dominio de unión es el barrido de alanina (véase, p. ej., Morrison KL y Weiss GA. Curr Opin Chem Biol. 2001 Jun;5(3):302-7), en donde cada residuo que va a analizarse se reemplaza por alanina, por ejemplo por medio de mutagénesis dirigida al sitio. Se utiliza la alanina debido a su grupo funcional metilo no voluminoso, químicamente inerte que, no obstante, imita las referencias de estructura secundaria que muchos de los otros aminoácidos poseen. A veces, los aminoácidos voluminosos como la valina o la leucina se pueden utilizar en los casos en los cuales la conservación del tamaño de los residuos mutados se desea.

Esta interacción entre el dominio de unión y el epítipo del antígeno diana implica que un dominio de unión presenta afinidad apreciable o significativa por el epítipo / el antígeno diana (en este caso: CLDN18.2 y CD3, respectivamente) y, generalmente, no presenta afinidad significativa por proteínas o antígenos distintos del antígeno diana (en este caso: CLDN18.2 / CD3) – a pesar de la reactividad cruzada comentada anteriormente con dianas homólogas, por ejemplo de otras especies. "Afinidad significativa" incluye unión con una afinidad (constante de disociación, KD) de $\leq 10^{-6}$ M. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-10}$ M o incluso $\leq 10^{-11}$ M, o $\leq 10^{-12}$ M. Si un dominio de unión reacciona (inmuno-)específicamente con o se une a una diana puede someterse a prueba fácilmente *por ejemplo* comparando la afinidad de dicho dominio de unión por su antígeno o proteína diana deseada con la afinidad de dicho dominio de unión con antígenos o proteínas no diana (en este caso: proteínas distintas de CLDN18.2 o CD3, respectivamente). Preferiblemente, un constructo de anticuerpo de la invención no se une significativamente a proteínas o antígenos distintos de CLDN18.2 o CD3, respectivamente (es decir, el primer dominio no se une a proteínas distintas de CLDN18.2 y el segundo dominio no se une a proteínas distintas de CD3) – a menos que cual(es)quier dominio(s) de unión adicional(es) dirigido(s) contra una diana adicional se introduzca(n) deliberadamente en el constructo de anticuerpo de la invención, en cuyo caso la unión de ese dominio de unión a su diana específica se proporciona también por la presente invención.

Se prevé que la afinidad del primer dominio por CLDN18.2 (por ejemplo CLDN18.2 humana) sea ≤ 100 nM, ≤ 90 nM, ≤ 80 nM, ≤ 70 nM, ≤ 60 nM, ≤ 50 nM, ≤ 40 nM, ≤ 30 nM o ≤ 20 nM. Estos valores se miden preferiblemente en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de Scatchard. Véase el ejemplo 4. Otros métodos de determinación de la afinidad también se conoce bien. Se prevé además que la afinidad del segundo dominio por CD3 (por ejemplo CD3 humana) sea ≤ 100 nM, ≤ 90 nM, ≤ 80 nM, ≤ 70 nM, ≤ 60 nM, ≤ 50 nM, ≤ 40 nM, ≤ 30 nM, ≤ 20

nM o ≤ 10 nM. Estos valores se miden preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo de Biacore. Véase el ejemplo 3.

El término "no se une significativamente" significa que un constructo de anticuerpo o dominio de unión de la presente invención no se une a una proteína o antígeno distinto de CLDN18.2 o CD3, cuando dicha proteína o antígeno se expresa en la superficie de una célula. El constructo de anticuerpo muestra por tanto una reactividad de $\leq 30\%$, preferiblemente $\leq 20\%$, más preferiblemente $\leq 10\%$, de manera particularmente preferible $\leq 9\%$, $\leq 8\%$, $\leq 7\%$, $\leq 6\%$, $\leq 5\%$, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, o $\leq 1\%$ con proteínas o antígenos distintos de CLDN18.2 o CD3 (cuando dichas proteínas o antígenos se expresan en la superficie de una célula), mediante lo cual la unión a CLDN18.2 o CD3, respectivamente, se establece que es del 100%. La "reactividad" puede expresarse por ejemplo en un valor de afinidad (véase anteriormente).

Se prevé que el constructo de anticuerpo de la invención (y más específicamente su primer dominio) no se una o no se una significativamente a parálogos de CLDN18.2, más específicamente a parálogos de CLDN18.2 humana y/o a parálogos de CLDN18.2 de macaco / cyno. También se prevé que el constructo de anticuerpo no se una o no se una significativamente a parálogos de CLDN18.2 (humana o de macaco / cyno) en la superficie de una célula diana. Los parálogos de CLDN18.2 incluyen, pero no se limitan a, CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6, y CLDN9. Según una realización, los parálogos humanos de CLDN18.2 tienen secuencias tal como se representa en SEQ ID NO: 2-10. Véanse el ejemplo 6 y la figura 6. Se prevé por tanto que el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención no se una o no se una significativamente a CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6, y/o CLDN9 (en la superficie de una célula diana).

El primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana. La "célula diana" puede ser cualquier célula procariota o eucariota que expresa CLDN18.2 en su superficie; preferiblemente la célula diana es una célula que es parte del cuerpo humano o animal, tal como una célula tumoral o cancerosa que expresa CLDN18.2 específica o una célula de una neoplasia positiva para CLDN18.2. Se entiende que el término "en la superficie", en el contexto de la presente invención, significa que el primer dominio del constructo de anticuerpo se une específicamente a un epítipo comprendido dentro de primer bucle extracelular de CLDN18.2 (CLDN18.2 ECL1), dentro del segundo bucle extracelular de CLDN18.2 (CLDN18.2 ECL2) o comprendido dentro de una combinación de ambos bucles. Se prevé por tanto que el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se una a un bucle extracelular de CLDN18.2, preferiblemente de CLDN18.2 humana. El bucle extracelular puede ser el primer bucle o el segundo bucle. También se prevé que ambos bucles contribuyan a la unión. En este caso, es posible que un bucle (tal como el primer bucle) represente la pareja de unión principal para el constructo de anticuerpo, y el otro bucle (tal como el segundo bucle) contribuya a la unión, por ejemplo como

pareja de estabilización, pero no es absolutamente esencial para la unión. El primer dominio según la invención puede unirse por tanto a CLDN18.2 cuando se expresa mediante líneas celulares o células que expresan de manera natural (tales como líneas de cáncer gástrico humano SNU-601, SNU-620, o también SNU-16, NUGC, NUG-C4, GSU o IM95), y/o mediante células o líneas celulares transformadas o transfectadas (de manera estable / transitoria) con CLDN18.2. En una realización, el primer dominio se une a CLDN18.2 cuando se usa CLDN18.2 como molécula diana en un ensayo basado en células tal como Scatchard (véase por ejemplo el ejemplo 4). Se prevé además que el constructo de anticuerpo / su primer dominio se una a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana. Una secuencia de aminoácidos preferida para CLDN18.2 humana se representa en SEQ ID NO: 1.

Se prevé que el constructo de anticuerpo según la invención (y, más específicamente, el primer dominio de dicho constructo de anticuerpo) se una al primer bucle extracelular (ECL1, bucle 1) de CLDN18.2. Esto no excluye necesariamente que el segundo bucle extracelular también contribuya, aunque en un menor grado, al sitio de interacción parátipo-epítipo. El término "CLDN18.2 ECL" (ECL = bucle extracelular) se refiere a las partes de CLDN18.2 que están esencialmente libres de los dominios transmembrana y citoplasmático de CLDN18.2. Se entiende que los dominios transmembrana identificados para el polipéptido de CLDN18.2 de la presente invención se identifican siguiente criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar pero lo más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio específicamente mencionado en la presente. Un CLDN18.2 ECL1 humano preferido se muestra en SEQ ID NO: 2, y un CLDN18.2 ECL2 humano preferido se muestra en SEQ ID NO: 3.

la presente invención proporciona además que:

- el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une al mismo epítipo de CLDN18.2 que un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

- a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

- b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se

representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

5 d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140;

- el constructo de anticuerpo de la invención compite por la unión con un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

10 a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

15 b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

20 c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140;

25 • el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 22, y opcionalmente también se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 24, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 23;

30

35 • el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 14 y/o a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 15, y opcionalmente también se une a uno o más mutantes de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

las representadas en SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 y 21, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 18;

- el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana, en el que Glu (E) en la posición 56 de CLDN18.2 humana es esencial, y Ala (A) en la posición 42 y/o Asn (N) en la posición 45 de CLDN18.2 humana es/son esencial(es) para la unión del primer dominio; y/o

- el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a un epítipo de CLDN18.2 que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 266, pero que no comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 265, y opcionalmente también que no comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 267.

Otros agentes de unión anti-CLDN18.2 (CL-3, CL-4) también se analizaron para determinar sus especificidades de unión a CLDN18.2 durante el mapeo de epítopos (véase el ejemplo 2). Estos constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 se encontró que tenían una especificidad de epítipo diferente, y al mismo tiempo se mostró que tenían un potencial citotóxico significativamente inferior en comparación con los constructos de anticuerpos de la invención. En el ejemplo 7.4, se demostró que los constructos de anticuerpos de la presente invención presentan valores de CE_{50} en el intervalo picomolar de dos dígitos, mientras que los constructos comparativos presentaban valores de CE_{50} en el intervalo picomolar de tres dígitos hasta cinco dígitos, a pesar de tener afinidades similares para CLDN18.2. Los constructos de anticuerpos que presentan actividad citotóxica del último intervalo podrían no ser suficientemente potentes para un uso terapéutico para dirigir el sistema inmunitario de un paciente, más específicamente la actividad citotóxica de las células T, contra células cancerosas. Por otro lado, los constructos de anticuerpos según la invención presentan una relación de epítipo-actividad muy favorable, apoyando por tanto una potencia actividad citotóxica mediada por constructos de anticuerpos.

Si un anticuerpo, constructo de anticuerpo o dominio de unión se une o no al mismo epítipo de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana como otro anticuerpo, constructo de anticuerpo o dominio de unión dado, puede medirse mediante diferentes análisis tal como se describe en la presente, *por ejemplo* mediante mapeo de epítopos con moléculas de CLDN18.2 quiméricas o mutadas, tal como se describió en la presente anteriormente o en los ejemplos 1 y 2. Otros métodos de determinación de epítopos se describen en la presente, tal como barrido de alaninas.

Si un anticuerpo o constructo de anticuerpo compite o no por la unión a un antígeno (tal como CLDN18.2) en la superficie de una célula diana con otro anticuerpo o constructo de

anticuerpo dado puede medirse en un ensayo de competición tal como un ELISA competitivo. También se pueden utilizar micropartículas (perlas) acopladas a avidina. De manera similar a una placa de ELISA recubierta con avidina, cuando se hace reaccionar con una proteína biotinilada, cada una de estas perlas se puede utilizar como un sustrato en el cual se puede realizar un ensayo. Se recubre el antígeno sobre una perla y después se prerecubre con el primer anticuerpo. Se agrega el segundo anticuerpo y se determina cualquier unión adicional. La lectura se produce por medio de citometría de flujo. Se usa preferiblemente un ensayo de competición basado en células, usando o bien células que expresan de manera natural CLDN18.2 o bien células que se transformaron de manera estable o transitoria con CLDN18.2. El término "compite por la unión", en el presente contexto significa que se produce competición entre los dos anticuerpos sometidos a prueba de al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90%, tal como se determina mediante uno cualquiera de los ensayos comentados anteriormente, preferiblemente el ensayo basado en células. El mismo análisis puede aplicarse por supuesto para otras dianas tales como CD3.

Los ensayos de unión competitiva de anticuerpos incluyen ensayos que determinan la unión competitiva de dos anticuerpos / constructos de anticuerpos a un antígeno unido a la superficie celular. Métodos comunes dirigidos a detectar la unión de dos anticuerpos / constructos de anticuerpos, A y B, a mismo antígeno en la superficie de una célula pueden incluir las etapas de:

a) el bloqueo del antígeno de superficie celular mediante incubación previa de células con anticuerpo / constructo de anticuerpo A seguido por una adición submáxima de anticuerpo / constructo de anticuerpo B marcado y detección de la unión de B en comparación con la unión en ausencia de A;

b) titulación (es decir, adición de cantidades diferentes) de anticuerpo / constructo de anticuerpo A en presencia de cantidades submáximas de anticuerpo / constructo de anticuerpo B marcado y detección del efecto sobre la unión de B; o

c) cotitulación de A y B, en la que ambos anticuerpos / constructos de anticuerpos se incuban juntos a concentración máxima y detección de si la unión total es igual a o excede la de o bien A o bien B solos, es decir, un método que no puede verse afectado por el orden de adición o las cantidades relativas de los anticuerpos / constructos de anticuerpos.

Cuando dos anticuerpos / constructos de anticuerpos A y B compiten por un antígeno unido a la superficie celular, los anticuerpos competirán muy a menudo entre sí en ensayos de bloqueo independientemente del orden de la adición de los anticuerpos. En otras palabras, se detecta competición si el ensayo se lleva a cabo en cualquier dirección. Sin embargo, este no siempre es el caso, y en determinadas circunstancias el orden de la adición de los anticuerpos

o la dirección del ensayo puede tener un efecto sobre la señal generada. Esto puede deberse a diferencias en las afinidades o avidedces de los anticuerpos / constructos de anticuerpos potencialmente competidores. Si el orden de adición tiene un efecto significativo sobre la señal generada, se concluye que los dos anticuerpos/constructos de anticuerpos compiten si se detecta competición en al menos un orden.

Según una realización, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana, en el que Glu (E) en la posición 56 de CLDN18.2 humana es esencial para la unión del primer dominio, y Ala (A) en la posición 42 y/o Asn (N) en la posición 45 de CLDN18.2 humana es/son esencial(es) para la unión del primer dominio; y/o En este contexto, el término "es esencial para la unión" significa que el aminoácido especificado (Glu en la posición 56) es necesario para que se produzca la unión del constructo de anticuerpo a CLDN18.2. Si se intercambia el aminoácido Glu en la posición 56, por ejemplo por Gln ($\rightarrow$ E56Q), la unión del constructo de anticuerpo se suprime o disminuye significativamente (véase la figura 4, columna denominada "P6"). El término "no es esencial para la unión" significa que el aminoácido especificado (Ala en la posición 42 y/o Asn en la posición 45) no es necesario para que se produzca la unión del constructo de anticuerpo a CLDN18.2. Si el aminoácido Ala en la posición 42 y/o Asn en la posición 45 se intercambia, por ejemplo por Ser en la posición 42 ($\rightarrow$ A42S) y/o Gln en la posición 45 ($\rightarrow$ N45Q), la unión del constructo de anticuerpo no disminuye o no disminuye significativamente (véase la figura 4, columnas denominadas "P3" y "P4").

Según una realización, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionada del grupo que consiste en:

a) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126; y

b) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138.

En el contexto de la presente invención, el término "variable" se refiere a las porciones de dominios de anticuerpo o inmunoglobulina que presentan variabilidad en su secuencia y que están implicadas en la determinación de la especificidad y afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, la(s) "región/regiones variable(s)"). Habitualmente, el apareamiento de una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) entre sí forma un sitio de unión a antígeno individual.

La variabilidad no está distribuida uniformemente a través de las regiones variables de anticuerpos; se concentra en subdominios de cada una de las regiones variables de cadena ligera y pesada. Estos subdominios se denominan regiones "hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR, por sus siglas en inglés). Las partes más conservadas (es decir, no hipervariables) de las regiones variables se denominan las regiones "marco" (FR), y proporcionan un andamiaje para las seis CDR en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. Las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos que se producen de manera natural comprenden cada una cuatro regiones FR (FR1, FR2, FR3 y FR4), que adoptan en gran parte una configuración de lámina β . Junto con las CDR, forman la siguiente secuencia dentro de una cadena pesada o ligera variable: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha mediante las regiones marco y, habitualmente junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno (véase Kabat *et al.*, *loc. cit.*).

El término "CDR", y su plural las "CDR", se refiere a la región determinante de complementariedad de las cuales tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3) y tres conforman el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo (o constructo de anticuerpo o dominio de unión) con el antígeno y, por lo tanto, contribuyen con la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: son los principales determinantes de especificidad de antígeno.

La definición exacta de los límites y longitudes de CDR se somete a diferentes sistemas de numeración y clasificación. Por lo tanto, las CDR pueden contemplarse en Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límites, que incluye el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de los límites diferentes, cada uno de estos sistemas tiene algún grado de solapamiento en lo que constituye las tan denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR de conformidad con estos sistemas difieren en áreas de longitud y límites con respecto a la región marco adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat (un enfoque que se basa en la variabilidad de secuencia entre especies), Chothia (un enfoque que se basa en estudios cristalográficos de complejos de anticuerpo y antígeno) y/o MacCallum (Kabat *et al.*, J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; y MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Otro estándar para caracterizar el sitio de unión al antígeno es la definición de AbM utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véanse, por ejemplo, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. En: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). En la medida en que dos

técnicas de identificación de restos definen las regiones de superposición, pero no las regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida. Sin embargo, se prefiere la numeración de conformidad con el tan denominado sistema Kabat.

Normalmente, las CDR forman una estructura de bucle que se puede clasificar como una estructura canónica. El término "estructura canónica" se refiere a la conformación de cadena principal que es adoptada por los bucles de unión al antígeno (CDR). A partir de estudios estructurales comparativos, se ha descubierto que cinco de los seis bucles de unión a antígeno tienen solo un repertorio limitado de conformaciones disponibles. Cada estructura canónica se puede caracterizar por los ángulos de torsión de la estructura principal polipeptídica. Los bucles correspondientes entre anticuerpos pueden, por lo tanto, tener estructuras tridimensionales muy similares, a pesar de la variabilidad de secuencia de aminoácidos elevada en la mayoría de las partes de los bucles (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia *et al.*, Nature, 1989, 342: 877; Martin y Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Además, existe una relación entre la estructura de bucle adoptada y las secuencias de aminoácidos que la rodea. La conformación de una clase canónica particular es determinada por la longitud del bucle y los restos de aminoácidos que se alojan en posiciones claves dentro del bucle, así como dentro del marco conservado (es decir, fuera del bucle). La asignación a una clase canónica particular por lo tanto se puede realizar basándose en la presencia de estos restos de aminoácidos claves.

El término "estructura canónica" también puede incluir consideraciones en cuanto a la secuencia lineal del anticuerpo, por ejemplo, según lo catalogado por Kabat (Kabat *et al.*, loc. cit.). El esquema de numeración de Kabat (sistema) es un estándar ampliamente adoptado para la numeración de los restos de aminoácidos de una región variable de anticuerpos de forma coherente y es el esquema preferido aplicado en la presente invención como también se menciona en otras partes de la presente. También se pueden utilizar consideraciones estructurales adicionales para determinar la estructura canónica de un anticuerpo. Por ejemplo, las diferencias no reflejadas completamente por la numeración Kabat pueden ser descritas por el sistema de numeración de Chothia *et al.* y/o descritas por otras técnicas, por ejemplo, la cristalografía y el modelado computacional bidimensional o tridimensional. Por consiguiente, una secuencia de anticuerpos determinada se puede colocar en una clase canónica que permite, entre otras cosas, identificar secuencias de clases apropiadas (por ejemplo, basadas en el deseo de incluir una variedad de estructuras canónicas en una biblioteca). La numeración Kabat de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos y las consideraciones estructurales descritas por Chothia *et al.*, loc. cit. y sus implicaciones para la interpretación de los aspectos canónicos de la estructura de los anticuerpos, se describen en la bibliografía. Se conocen en la técnica las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas. Para obtener un

análisis de la estructura de los anticuerpos, véase *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988.

La CDR3 de la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión al antígeno dentro de las regiones variables de cadena pesada y ligera. En algunos anticuerpos o constructos de anticuerpos / dominios de unión, la cadena pesada CDR3 parece conformar la mayor área de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Los esquemas de selección *in vitro* en los que el CDR3 solo varía pueden utilizarse para modificar las propiedades de unión de un anticuerpo o constructo de anticuerpo / dominio de unión o determinar qué restos contribuyen a la unión de un antígeno. Por lo tanto, la CDR3 es típicamente la mayor fuente de diversidad molecular en el sitio de unión al anticuerpo. Por ejemplo, CDR-H3 puede ser tan corto como de dos restos de aminoácidos o tener más de 26 aminoácidos.

En un anticuerpo o inmunoglobulina de longitud completa clásico, cada cadena ligera (L) está unida a una cadena pesada (H) mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de la cadena H. El dominio constante de cadena pesada (CH) más proximal a VH se designa habitualmente como CH1. Los dominios constantes ("C") no están implicados directamente en la unión al antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y activación del complemento (citotoxicidad dependiente del complemento, CDC). La región Fc de un anticuerpo en la región de "cola" de un anticuerpo clásico que interacciona con receptores de superficie celular denominados receptores de Fc y algunas proteínas del sistema del complemento. En isotipos de anticuerpos de IgG, IgA e IgD, la región Fc se compone de dos fragmentos proteicos idénticos, derivados de los dominios constantes segundo y tercero (CH2 y CH3) de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Las regiones Fc de IgM e IgE contienen tres dominios constantes de cadena pesada (CH2, CH3 y CH4) en cada cadena polipeptídica. Las regiones Fc contienen también parte de la denominada región "bisagra" mantenida junta por uno o más disulfuros e interacciones no covalentes. La región Fc de una IgG que se produce de manera natural lleva un sitio de N-glicosilación altamente conservado. La glicosilación del fragmento de Fc es esencial para la actividad mediada por receptor de Fc.

La ADCC es un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por células mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario lisa de manera activa una célula diana, a cuyos antígenos de membrana-superficie se han unido anticuerpos específicos. La ADCC requiere una célula efectora inmunitaria que se sabe clásicamente que es una célula citolítica natural (NK) que interacciona normalmente con anticuerpos de IgG. Sin embargo, la ADCC también puede estar mediada por macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. La ADCC implica la activación de células efectoras que expresan receptores de Fc mediante anticuerpos que

expresan una porción de Fc. Por ejemplo, el receptor de Fc más común en la superficie de una célula NK se denomina CD16 o FcγRIII. Una vez que el receptor de Fc se une a la región Fc de IgG, la célula NK libera factores citotóxicos que provocan la muerte de la célula diana. Asimismo, el receptor de Fc (FceRI) de un eosinófilo reconocerá a IgE. En CDC, en cambio, la molécula "C1q" del sistema del complemento se une a la región Fc del anticuerpo, y esta unión desencadena la cascada del complemento que conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) en la superficie de la célula diana, como resultado de la activación de la ruta clásica del complemento. En anticuerpos o constructos de anticuerpos terapéuticos, tanto ADCC como CDC pueden modularse mediante modificación por ingeniería genética del isotipo de Fc, mutaciones genéticas de Fc o modificaciones del perfil de glicosilación de Fc.

La secuencia de genes de anticuerpos después del ensamblaje y la mutación somática es muy variada, y se estima que estos genes variados codifican 10^{10} moléculas de anticuerpos diferentes (Immunoglobulin Genes, 2ª ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). En consecuencia, el sistema inmunitario proporciona un repertorio de inmunoglobulinas. El término "repertorio" se refiere a al menos una secuencia de nucleótidos derivada total o parcialmente de al menos una secuencia que codifica al menos una inmunoglobulina. La(s) secuencia(s) se puede(n) generar mediante reordenamiento *in vivo* de los segmentos V, D y J de cadenas pesadas, y los segmentos V y J de cadenas ligeras. Alternativamente, la(s) secuencia(s) se puede(n) generar de una célula en respuesta a la cual se produce el reordenamiento, p. ej., estimulación *in vitro*. Alternativamente, parte o la totalidad de la(s) secuencia(s) se puede(n) obtener mediante corte y empalme de ADN, síntesis de nucleótidos, mutagénesis y otros métodos, véase, p. ej., la patente de Estados Unidos 5,565,332. Un repertorio puede incluir una sola secuencia o puede incluir múltiples secuencias, incluidas las de una colección genéticamente diversa.

Se prevé que el constructo de anticuerpo tenga una pinza de cisteínas dentro del primer dominio. La pinza de cisteínas puede introducirse para mejorar la estabilidad del constructo. Véase por ejemplo el documento US 2016/0193295.

En una realización de la invención, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 127 o SEQ ID NO: 139. En una realización adicional, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 140. En otra realización, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención comprende una región VH y una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 127+128 (VH+VL) o SEQ ID NO: 139+140 (VH+VL). En aún una realización adicional, el primer dominio del constructo de anticuerpo de la invención comprende un

polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 129 o SEQ ID NO: 141.

Tal como se describió en la presente anteriormente, la invención proporciona una realización en la que el constructo de anticuerpo está en un formato seleccionado del grupo que consiste en (scFv)₂, scFv-mAb de un solo dominio, diacuerpos y oligómeros de cualquiera de los formatos anteriormente mencionados. El término "está en un formato" no excluye que el constructo pueda modificarse adicionalmente, *por ejemplo* mediante unión o fusión a otros restos, tal como se describe en la presente. Según una realización del constructo de anticuerpo de la presente invención, el primer y/o el segundo dominio están en el formato de un scFv. En un scFv, la región VH y la región VL se disponen en el orden VH-VL o VL-VH (desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal). Se prevé que las regiones VH y VL del primer y/o el segundo dominio de unión se conecten por medio de un ligador, preferiblemente un ligador peptídico. Según una realización del primer y/o el segundo dominio, la región VH se sitúa de manera N-terminal del ligador, y la región VL se sitúa de manera C-terminal del ligador. En otras palabras, en una realización del primer y/o el segundo dominio, el scFv comprende desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal: VH-ligador-VL. Se prevé además que el primer dominio y el segundo dominio del constructo de anticuerpo se conecten por medio de un ligador, preferiblemente un ligador peptídico. El constructo de anticuerpo puede comprender por ejemplo los dominios en el orden (desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal) el primer dominio – ligador – segundo dominio. También es posible el orden inverso (segundo dominio – ligador – primer dominio).

Los ligadores son preferiblemente ligadores peptídicos, más preferiblemente ligadores peptídicos cortos. Según la presente invención, un "ligador peptídico" comprende una secuencia de aminoácidos que conecta las secuencias de aminoácidos de un dominio con otro dominio (variable y/o de unión) (por ejemplo un dominio variable o un dominio de unión) del constructo de anticuerpo. Una característica técnica esencial de dicho enlazador peptídico es que no comprende ninguna actividad de polimerización. Entre los ligadores peptídicos adecuados están los descritos en las patentes estadounidenses 4,751,180 y 4,935,233 o el documento WO 88/09344. Los ligadores peptídicos también pueden usarse para unir otros dominios o módulos o regiones (tales como los dominios que extienden la semivida) al constructo de anticuerpo de la invención. Se muestran ejemplos de ligadores peptídicos útiles en SEQ ID NO: 155-168. En el presente contexto, un ligador "corto" tiene entre 2 y 50 aminoácidos, preferiblemente entre 3 y 35, entre 4 y 30, entre 5 y 25, entre 6 y 20 o entre 6 y 17 aminoácidos. El ligador entre dos regiones variables de un dominio de unión puede tener una longitud diferente (por ejemplo puede ser más largo) que el ligador entre los dos dominios de unión. Por ejemplo, el ligador entre dos regiones variables de un dominio de unión puede tener una longitud de entre 7 y 15 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 13, y el ligador entre

los dos dominios de unión puede tener una longitud de entre 3 y 10 aminoácidos, preferiblemente entre 4 y 8. Se prevé además que los ligadores peptídicos sean ligadores de glicina/serina, tales como los representados en SEQ ID NO: 156 y 158-168. La mayoría de los aminoácidos en los ligadores de glicina/serina se seleccionan de glicina y serina.

5 En caso de que se utilice un ligador, este ligador es preferentemente de una longitud y secuencia suficiente para asegurar que cada uno de los primeros y segundos dominios puedan, independientemente uno del otro, conservar sus especificidades de unión diferenciales. Para ligadores peptídicos que conectan los al menos dos dominios de unión (o las dos regiones variables que forman un dominio de unión) en el constructo de anticuerpo, se
10 prevé que esos ligadores peptídicos comprendan sólo un pequeño número de residuos de aminoácido, *por ejemplo* 12 residuos de aminoácido o menos. Por lo tanto, se prefieren enlazadores peptídicos de los residuos de aminoácidos 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5. Un enlace peptídico previsto con menos de 5 aminoácidos comprende 4, 3, 2 o un aminoácido caracterizado porque se prefieren los enlaces ricos en Gly. Un ligador de "un solo aminoácido"
15 en el contexto de dicho "ligador peptídico" es Gly. Otra realización de un ligador peptídico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, es decir Gly₄Ser (SEQ ID NO: 156), o polímeros de esta, es decir, (Gly₄Ser)_x, donde x es un entero de 1 o mayor (por ejemplo, 2 o 3). Se representan ligadores utilizables en SEQ ID NO: 155-163. Las características de dichos ligadores peptídicos se conocen en la técnica y se describen *por
20 ejemplo* en Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) y Raag y Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Se prefieren ligadores peptídicos que no promueven ninguna estructura secundaria. La unión de dichos dominios entre sí puede proporcionarse, *por ejemplo*, mediante ingeniería genética. Se conocen en la técnica los métodos para preparar constructos monocatenarios biespecíficos unidos
25 operativamente y que se expresan en células o bacterias de mamíferos (por ejemplo, WO 99/54440 o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2001).

Según una realización de la invención, el constructo de anticuerpo de la invención es un "constructo de anticuerpo de cadena sencilla". También se prevé que cualquiera del primer
30 o segundo o ambos dominios de unión pueda estar en el formato de un "Fv de cadena sencilla" (scFv). Aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir usando métodos recombinantes mediante un ligador artificial, tal como se describió anteriormente, que permite convertirlos en una cadena proteica simple en donde las regiones VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente; véase,
35 p. ej., Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante el uso de técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se examinan para que funcionen de la misma manera

que anticuerpos de longitud completa o IgG. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es por tanto una proteína de fusión de la región variable de cadena pesada (VH) y de cadena ligera (VL) de inmunoglobulinas, conectada generalmente con un péptido ligador corto. El ligador generalmente es rico en glicina para la flexibilidad, así como en serina o también treonina para la solubilidad, y puede o bien conectar el extremo N de VH con el extremo C de VL o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador.

Se conocen en la técnica moléculas de cadena sencilla biespecíficas y se describen en el documento WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Las técnicas descritas para producir constructos de anticuerpos de cadena sencilla (véanse, entre otros, la patente estadounidense 4,946,778, Kontermann y Dübel (2010), *loc. cit.* y Little (2009), *loc. cit.*) pueden adaptarse para producir constructos de anticuerpo de cadena sencilla que reconocen específicamente (una) diana(s) elegida(s).

Los fragmentos variables de cadena sencilla biespecíficos o bivalentes (también denominados divalentes) (bi-scFv o di-scFv) que tienen el formato (scFv)₂ se pueden modificar genéticamente mediante la unión de dos moléculas de scFv (p. ej., con los ligadores descritos anteriormente en la presente). La unión se puede realizar mediante la producción de una cadena polipeptídica individual con dos regiones VH y dos regiones VL, lo que produce scFv en tándem (véase, por ejemplo, Kufer P. *et al.*, (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Otra posibilidad es la creación de moléculas scFv con péptidos enlazadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen entre sí (por ejemplo, alrededor de cinco aminoácidos) lo que fuerza a los scFv a dimerizarse. En este caso, la VH y la VL de un dominio de unión (que se une o bien al antígeno diana CLDN18.2 o bien a CD3) no están conectadas directamente por medio de un ligador peptídico. Por tanto, la VH del dominio de unión a CD3 puede fusionarse por ejemplo a la VL del dominio de unión a CLDN18.2 por medio de un ligador peptídico, y la VH del dominio de unión a CLDN18.2 se fusiona a la VL del dominio de unión a CD3 por medio de tal ligador peptídico. Este tipo se denomina diacuerpos (véase, por ejemplo, Hollinger, Philipp *et al.*, (julio de 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

Los constructos de anticuerpos denominados "anticuerpos de un solo dominio" comprenden una región variable de anticuerpo (monomérica) que puede unirse selectivamente a un antígeno específico, independientemente de otras regiones variables. Los primeros anticuerpos de dominio simple se diseñaron a partir de anticuerpos de cadena pesada encontrados en camélidos y estos se denominan fragmentos V_HH. Los peces cartilaginosos también tienen anticuerpos de cadena pesada (IgNAR) de los cuales se pueden obtener

anticuerpos de dominio simple denominados fragmentos V_{NAR} . Un enfoque alternativo es dividir las regiones variables diméricas de inmunoglobulinas comunes en monómeros, obteniendo por tanto VH o VL como Ab de un solo dominio. Aunque la mayor parte de la investigación en anticuerpos de un solo dominio se basa actualmente en regiones variables de cadena pesada, también se mostró que nanocuerpos derivados de cadenas ligeras se unen específicamente a epítomos diana. Algunos ejemplos de anticuerpos de dominio simple se denominan sdAb, nanocuerpos o anticuerpos de dominio variable simple. Un (mAb de un solo dominio)₂ es por tanto un constructo de anticuerpo monoclonal compuesto por (al menos) dos constructos de anticuerpos monoclonales de un solo dominio, que se seleccionan individualmente del grupo que comprende VH, VL, V_{HH} y V_{NAR} . El ligador está preferiblemente en forma de un ligador peptídico. De forma similar, un "scFv-mAb de dominio simple" es una construcción de anticuerpos monoclonales compuesta de al menos un anticuerpo de dominio simple tal como se describió anteriormente y una molécula scFv tal como se describió anteriormente. Nuevamente, el enlazador preferentemente se encuentra en forma de un enlazador de péptidos.

También se prevé que el constructo de anticuerpo de la invención tenga, además de su función para unirse a las moléculas diana CLDN18.2 y CD3, una función adicional. En este formato, el constructo de anticuerpo puede ser un constructo de anticuerpo trifuncional o multifuncional seleccionando como diana células diana a través de unión a CLDN18.2, mediando en la actividad de células T citotóxicas a través de unión a CD3 y proporcionando una función adicional tal como medios o dominios para potenciar o prolongar la semivida sérica, un dominio constante de Fc completamente funcional o modificado que media en la ADCC a través del reclutamiento de células efectoras, un marcador (fluorescente, etc.), un agente terapéutico tal como una toxina o un radionúclido, etc.

Los ejemplos de medios o dominios para prolongar la semivida sérica de los constructos de anticuerpos de la invención incluyen péptidos, proteínas o dominios de proteínas, que están fusionados o unidos de otra forma a los constructos de anticuerpos. El grupo de péptidos, proteínas o dominios proteicos incluye péptidos que se unen a otras proteínas con perfil farmacocinético preferido en el cuerpo humano tal como albúmina sérica (véase el documento WO 2009/127691). Un concepto alternativo de tales péptidos que prolongan la semivida incluye péptidos que se unen al receptor de Fc neonatal (FcRn, véase el documento WO 2007/098420), que pueden usarse también en los constructos de anticuerpos de la presente invención. El concepto de unir dominios más grandes de proteínas o proteínas completas incluye la fusión de albúmina sérica humana, variantes o mutantes de albúmina sérica humana (véanse los documentos WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) o dominios de la misma, así como la fusión de una región constante de inmunoglobulina (dominio Fc) y

variantes de los mismos. Tales variantes de dominios Fc se denominan dominios basados en Fc y pueden por ejemplo optimizarse / modificarse con el fin de permitir el apareamiento deseado de dímeros o multímeros, para suprimir la unión al receptor de Fc (por ejemplo para evitar ADCC o CDC) o por otros motivos. Un concepto adicional conocido en la técnica para

5 prolongar la semivida de sustancias o moléculas en el cuerpo humano es la pegilación de esas moléculas (tal como los constructos de anticuerpos de la presente invención).

En una realización, los constructos de anticuerpos según la invención se unen (*por ejemplo* por medio de un enlace peptídico) con una pareja de fusión (tal como una proteína, polipéptido o péptido), *por ejemplo* para el fin de prolongar la semivida sérica del constructo.

10 Estas parejas de fusión pueden seleccionarse de albúmina sérica humana ("HSA" o "HALB") así como variantes de secuencia de la misma, péptidos que se unen a HSA, péptidos que se unen a FcRn ("FcRn BP") o constructos que comprenden una región Fc (derivada de anticuerpo). Se representan secuencias a modo de ejemplo de estas parejas de fusión en SEQ ID NO: 170-232. En general, las parejas de fusión pueden unirse al extremo N-terminal o

15 al extremo C-terminal de los constructos de anticuerpos según la invención, o bien directamente (*por ejemplo* por medio de un enlace peptídico) o bien a través de un ligador peptídico tal como (GGGGS)_n (en el que "n" es un número entero de 2 o mayor, por ejemplo 2 o 3 o 4). Se representan ligadores peptídicos adecuados en SEQ ID NO: 155-163.

Por tanto, se prevé que un constructo de anticuerpo según la presente invención

20 comprenda:

(a) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico

25 comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155-163; y

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo

30 que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- opcionalmente una etiqueta de His, por ejemplo seleccionada de SEQ ID NO:

35 169, 269, 270 o 271;

(b) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155-163;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- opcionalmente un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155-163;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 170 y 176-205; y

- opcionalmente una etiqueta de His, por ejemplo seleccionada de SEQ ID NOs: 169, 269, 270 o 271;

(c) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos QRFVTGHFGGLX₁PANG (SEQ ID NO: 171) en la que X₁ es Y o H; y

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 155-163;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 173 o SEQ ID NO: 175; y

- opcionalmente una etiqueta de His, por ejemplo seleccionada de SEQ ID NO: 169, 269, 270 o 271;

5 (d) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115, y SEQ ID NO: 118;

10

- un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 162;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 128 y la SEQ ID NO: 140, seguido por un residuo de serina en el extremo C-terminal;

15

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 206; y

un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

20

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 127 y la SEQ ID NO: 139;

- un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 162;

25

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116, y SEQ ID NO: 119; seguido por un residuo de serina en el extremo C-terminal; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 207;

30

(e) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115, y SEQ ID NO: 118;

35

- un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 162;

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 128 y la SEQ ID NO: 140; y

5 • un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 208; y

un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal:

10 • un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 127 y la SEQ ID NO: 139;

- un ligador peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 162;

15 • un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116, y SEQ ID NO: 119 seguido por un residuo de serina en el extremo C-terminal; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 209;

20 (f) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal:

25 • un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155-163;

30 • un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 210; y

35 un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 211;

(g) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 212; y

un polipéptido que comprende en el siguiente orden partiendo del extremo N-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 213;

(h) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 214; y

un polipéptido que comprende en el siguiente orden partiendo del extremo N-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 215;

o

(i) un polipéptido que comprende en el siguiente orden desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal:

- un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

5 • un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155-163;

10 • un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168; y

- un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 216.

15 Según otra realización, el constructo de anticuerpo de la invención comprende (además del primer y segundo dominio) un tercer dominio que comprende dos monómeros polipeptídicos, comprendiendo cada uno una bisagra, un dominio CH2 y un CH3, en el que dichos dos monómeros polipeptídicos se fusionan entre sí por medio de un ligador peptídico. Se prevé que dicho tercer dominio comprenda en un orden de N-terminal a C-terminal: bisagra-CH2-CH3-ligador-bisagra-CH2-CH3. Se representan secuencias de aminoácidos que
20 pueden usarse para dicho tercer dominio en SEQ ID NO: 225-232. Cada uno de dichos monómeros polipeptídicos pueden tener una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 217-224, o que es al menos el 90% idéntica a esas secuencias. En otra realización, los dominios primero y segundo del constructo de anticuerpo de la invención se fusionan al tercer dominio por medio de un ligador peptídico que se
25 selecciona por ejemplo del grupo que consiste en SEQ ID NO: 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 o 163.

30 En línea con la presente invención, una "bisagra" es una región bisagra de IgG. Esta región puede identificarse por analogía usando la numeración de Kabat, véanse por ejemplo las posiciones de Kabat 223-243. En línea con lo anterior, el requisito mínimo para una "bisagra" son los residuos de aminoácido correspondientes al tramo de secuencia de IgG₁ de D231 a P243 según la numeración de Kabat. Los términos "CH2" y "CH3" se refieren a las regiones constantes de cadena pesada se inmunoglobulina 2 y 3. Estas regiones pueden identificarse también por analogía usando la numeración de Kabat, véanse por ejemplo las
35 posiciones de Kabat 244-360 para CH2 y las posiciones de Kabat 361-478 para CH3. Se entiende que hay algo de variación entre las inmunoglobulinas en cuanto a su región Fc de IgG₁, región Fc de IgG₂, región Fc de IgG₃, región Fc de IgG₄, región Fc de IgM, región Fc de

IgA, región Fc de IgD y región Fc de IgE (véase, *por ejemplo*, Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993)). El término región Fc se refiere a las dos últimas regiones constantes de cadena pesada de IgA, IgD e IgG, y las tres últimas regiones constantes de cadena pesada de IgE e IgM. La región Fc puede incluir también la bisagra flexible N-terminal con respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, la región Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, la región Fc comprende los dominios de inmunoglobulina CH2 y CH3 y la bisagra entre los primeros dos dominios y CH2. Aunque los límites de la región Fc de una inmunoglobulina pueden variar, un ejemplo de una porción de Fc de cadena pesada de IgG humana que comprende una bisagra funcional, un dominio CH2 y CH3 puede definirse por ejemplo para que comprenda los residuos D231 (del dominio bisagra) a P476 (del extremo C-terminal del dominio CH3), o de D231 a L476, respectivamente, para IgG₄, en el que la numeración es según Kabat.

El constructo de anticuerpo de la invención puede comprender por tanto en un orden N- a C-terminal:

- (a) el primer dominio;
- (b) un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 156, 162 y 163;
- (c) el segundo dominio;
- (d) un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 155, 156, 158, 159, 160, 162, y 163;
- (e) el primer monómero polipeptídico del tercer dominio (que comprende una bisagra, un dominio CH2 y uno CH3);
- (f) un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 165, 166, 167, y 168; y
- (g) el segundo monómero polipeptídico del tercer dominio (que comprende una bisagra, un dominio CH2 y uno CH3).

También se prevé que el constructo de anticuerpo de la invención comprenda en un orden de N- a C-terminal:

- el primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 129 y la SEQ ID NO: 141; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NOs: 155-162 y 164-168;
- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 156, 162 y 163;
- teniendo el segundo dominio una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255; en el que el ligador peptídico comprendido dentro de

esas secuencias y que tiene SEQ ID NO: 163 puede reemplazarse por una cualquiera de SEQ ID NO: 155-162 y 164-168;

- un ligador peptídico que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 155, 156, 158, 159, 160, 162, y 163; y

5 • teniendo el tercer dominio una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 225-232.

Por tanto, en una realización, el constructo de anticuerpo de la presente invención comprende o consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las representadas en SEQ ID NO: 131, la SEQ ID NO: 132, la SEQ ID NO: 143 o en SEQ ID NO: 144.

Las modificaciones covalentes de los constructos de anticuerpos también se incluyen dentro del alcance de esta invención y generalmente, pero no siempre, se hacen post-traduccionalmente. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones del constructo de anticuerpo a la molécula mediante la reacción de residuos de aminoácidos específicos del constructo de anticuerpo con un agente de derivación orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos del extremo N- o C-terminales. La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular los constructos de anticuerpos de la presente invención a una superficie o matriz de soporte insoluble en agua para usarse en una variedad de métodos. Los restos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán con frecuencia a los correspondientes restos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. De manera alternativa, estos restos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo y treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, págs. 79-86) acetilación de la amina del extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente de los constructos de anticuerpos incluida dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glucosilación de la proteína. Como se conoce en la técnica, los patrones de glucosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (p. ej., la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glucosilación particulares, como se analiza a continuación), o la célula u organismo huésped en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se describen a continuación. La glucosilación de polipéptidos está normalmente unida a N o unida a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina,

donde X es cualquier aminoácido salvo prolina, son secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación con unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación a la construcción de anticuerpos se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma tal que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación unidos a N). La alteración también se puede hacer mediante la adición, o la sustitución, de uno o más residuos de serina o treonina con respecto a la secuencia de inicio (para los sitios de glucosilación ligados a O). Para mayor claridad, la secuencia de aminoácidos de un constructo de anticuerpo puede alterarse mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de forma que se generen codones que se traducirán en aminoácidos deseados.

Otro medio para aumentar la cantidad de restos de carbohidratos en la construcción de anticuerpos es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación unida a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, uno o más azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330, y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

La remoción de restos de carbohidrato presentes en la construcción de anticuerpos de partida se puede lograr química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja el polipéptido intacto. La desglucosilación química se describe por Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y por Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de restos de carbohidratos en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo y exo-glucosidasas como se describe por Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. La glucosilación en los sitios potenciales de glucosilación se puede impedir mediante el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin *et*

al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glicósido.

Otras modificaciones de la construcción de anticuerpos también se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, otro tipo de modificación covalente del constructo de anticuerpo comprende unir el constructo de anticuerpo a diversos polímeros no proteínicos, incluyendo polioles, de la manera expuesta en las patentes estadounidenses número 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337. Además, tal como se sabe en la técnica, las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en diversas posiciones dentro de la construcción de anticuerpos, p. ej., para facilitar la adición de polímeros tales como polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los constructos de anticuerpos de la invención comprende la adición de una o más etiquetas. El grupo de marcaje se puede acoplar a la construcción de anticuerpos a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para etiquetar proteínas y pueden usarse para realizar la presente invención. El término "etiqueta" o "grupo de marcaje" se refiere a cualquier etiqueta detectable. En general, las etiquetas se clasifican en una diversidad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar. Los siguientes ejemplos incluyen, pero sin limitación:

- a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, tales como radioisótopos o radionúclidos (*por ejemplo*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)
- b) marcadores magnéticos (*por ejemplo*, partículas magnéticas)
- c) restos activos redox
- d) tintes ópticos (incluyendo, pero sin limitación, cromóforos, fósforos y fluoróforos), como grupos fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, lantánidos fosfóricos), grupos quimioluminiscentes y fluoróforos que pueden ser fluoros de "molécula pequeña" o fluoros proteicos
- e) grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina)
- f) grupos biotinilados
- g) epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítomo, etc.)

Por "etiqueta fluorescente" se entiende cualquier molécula que puede detectarse a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen, pero sin limitación, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde de malaquita, estilbeno, amarillo de Lucifer, Cascade

BlueJ, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, rojo LC 640, Cy 5, Cy 5.5, rojo LC 705, verde de Oregon, los colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina, y rojo Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Los colorantes ópticos adecuados, que incluyen fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Los marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero sin limitación, proteína verde fluorescente, incluyendo una especie de Renilla, *Ptilosarcus*, o Aequorea de GFP (Chalfie *et al.*, 1994, *Science* 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Número de Acceso a Genbank® U55762), proteína azul fluorescente (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8ª planta, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, *Biotechniques* 24:462-471; Heim *et al.*, 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417), β galactosidasa (Nolan *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2603-2607) y Renilla (documentos WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, patente de Estados Unidos N.º 5,292,658; 5,418,155; 5,683,888; 5,741,668; 5,777,079; 5,804,387; 5,874,304; 5,876,995; 5,925,558).

Los dominios de una cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión a ADN (Landschulz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759) y desde entonces se han encontrado en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos de origen natural y derivados de estos que dimerizan o trimerizan. Los ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva de pulmón (SPD, por sus siglas en inglés) descrita en Hoppe *et al.*, 1994, *FEBS Letters* 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permita la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a esta se describe en Fanslow *et al.*, 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78.

El constructo de anticuerpo de la invención también puede comprender dominios adicionales, que son, p. ej., útiles en el aislamiento de la molécula o se relaciona con un perfil farmacocinético adaptado de la molécula. Los dominios útiles para el aislamiento de un constructo de anticuerpo pueden seleccionarse de motivos peptídicos o restos introducidos de forma secundaria, que pueden capturarse en un método de aislamiento, p. ej., una columna de aislamiento. Las realizaciones no limitantes de dichos dominios adicionales comprenden motivos peptídicos conocidos como etiqueta Myc, etiqueta HAT, etiqueta HA, etiqueta TAP,

etiqueta GST, dominio de unión a quitina (etiqueta CBD), proteína de unión a maltosa (etiqueta MBP), etiqueta Flag, etiqueta Strep y variantes de las mismas (p. ej., etiqueta StrepII) y etiqueta His. Todos los constructos de anticuerpos dados a conocer en la presente caracterizados por las CDR identificadas pueden comprender un dominio de etiqueta de His, que se conoce generalmente como una repetición de residuos de His consecutivos en la secuencia de aminoácidos de una molécula, por ejemplo de cinco residuos de His (SEQ ID NO: 269), o de seis residuos de His (hexa-histidina, SEQ ID NO: 169). Esta etiqueta de His puede ubicarse *por ejemplo* en el extremo N- o C-terminal del constructo de anticuerpo. En una realización, una etiqueta de hexa-histidina (HHHHHH) se une por medio de un enlace peptídico al extremo C-terminal del constructo de anticuerpo según la invención.

También se prevé que el constructo de anticuerpo de la presente invención comprenda o consista en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en SEQ ID NO: 130 y 142, y que se une a su extremo N-terminal o a su extremo C-terminal con una etiqueta de purificación de proteína, preferiblemente por medio de un enlace peptídico (enlace amida). Se prefiere la unión de la etiqueta de purificación de proteína al extremo C-terminal del polipéptido. Se prevé que la etiqueta de purificación de proteína sea un péptido corto. Por ejemplo, la longitud del péptido corto puede ser de 2-30 aminoácidos, 4-25 aminoácidos, 5-20 aminoácidos o 6-19 aminoácidos. Los ejemplos de etiqueta de purificación de proteína incluyen, pero no se limitan a, epítipo AU1 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 272), epítipo AU5 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 273), etiqueta T7 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 274), etiqueta V5 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 275), etiqueta B (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 276), epítipo E2 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 277), epítipo FLAG / etiqueta FLAG (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 278), etiqueta Glu-Glu (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 279 o 280), etiqueta HA, etiqueta de afinidad de histidina (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 281), epítipo HSV (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 282), epítipo KT3 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 283), epítipo Myc (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 284), etiqueta de poliarginina (5-6 residuos de Arg), etiqueta de poliaspartato (5-16 residuos de Asp), etiqueta de polihistidina (2-10 residuos de His, habitualmente 6 residuos de His, véanse por ejemplo SEQ ID NO: 169 y 269-271), etiqueta de polifenilalanina (habitualmente 11 residuos de Phe), etiqueta S1 (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 285), etiqueta S (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 286), etiqueta Strep (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 287 o 288), etiqueta universal (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 289), VSV-G (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 290), proteína C (por ejemplo tal como se representa en SEQ ID NO: 291) y proteína A. Se prefiere

una etiqueta de histidina, especialmente una etiqueta de 6x His (SEQ ID NO: 169). Se prevé adicionalmente por tanto que el constructo de anticuerpo de la presente invención consista en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en SEQ ID NO: 130 y 142, y que se une a su extremo C-terminal con una etiqueta de 6xHis por medio de un enlace peptídico. Una realización del constructo de anticuerpo de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO: 143.

Las células T o los linfocitos T son un tipo de linfocito (en sí son un tipo de glóbulo blanco) que cumplen una función fundamental en la inmunidad mediada por células. Existen varios subconjuntos de linfocitos T, cada uno con una función distinta. Los linfocitos T pueden distinguirse de otros linfocitos, como los linfocitos B o los linfocitos NK por la presencia de un receptor de linfocitos T (TCR) en la superficie celular. El TCR es responsable de reconocer antígenos unidos a moléculas de complejos de histocompatibilidad principal (MHC) y está compuesto por dos cadenas de proteínas diferentes. En el 95 % de los linfocitos T, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y beta (β). Cuando el TCR se acopla con un péptido antigénico y MHC (péptido/complejo de MHC), el linfocito T se activa a través de una serie de eventos bioquímicos mediados por enzimas asociadas, correceptores, moléculas adaptadoras especializadas y factores de transcripción activados o liberados.

El constructo de anticuerpo de la invención comprende un dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T. "CD3" (agrupación de diferenciación 3) es un correceptor de células T compuesto por cuatro cadenas. En mamíferos, el complejo de proteína CD3 contiene una cadena CD3 γ (gamma), una cadena CD3 δ (delta) y dos cadenas CD3 ϵ (épsilon). Estas cuatro cadenas se asocian con el receptor de linfocitos T (TCR) y la denominada cadena ζ (zeta) para formar el "complejo del receptor de linfocitos T" y para generar una señal de activación en los linfocitos T. Las cadenas CD3 γ (gamma), CD3 δ (delta) y CD3 ϵ (épsilon) son proteínas de superficie celular altamente relacionadas de la superfamilia de inmunoglobulina y contienen cada una un dominio de inmunoglobulina extracelular simple. Las colas intracelulares de las moléculas CD3 contienen un motivo conservado simple conocido como un motivo de activación basado en el inmunorreceptor tirosina o (ITAM), que es fundamental para la capacidad de señalización del TCR. La molécula CD3 épsilon es un polipéptido que en los seres humanos está codificado por el gen CD3E que se aloja en el cromosoma 11.

La lisis redirigida de células diana por medio del reclutamiento de células T mediante un constructo de anticuerpo que se une a CD3 en la célula T y a una proteína diana en la célula diana implica generalmente la formación de sinapsis citolíticas y el suministro de perforina y granzimas. Los linfocitos T captados son capaces de realizar lisis de células objetivo serial, y no están afectados por mecanismos de escape inmunológico que interfieren

con el procesamiento y presentación del antígeno de péptidos, o la diferenciación de linfocitos T clonales; véase, por ejemplo, el documento WO 2007/042261.

La citotoxicidad mediada por los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 puede medirse de diversos modos. Véase el ejemplo 7. La "mitad de la concentración eficaz

5 máxima" (CE_{50}) se usa comúnmente como una medida de la potencia de una molécula biológicamente activa tal como un constructo de anticuerpo de la presente invención. Puede expresarse en unidades molares. En el presente caso de medición de la citotoxicidad, el valor de CE_{50} se refiere a la concentración de un constructo de anticuerpo que induce una respuesta citotóxica (lisis de células diana) a mitad de camino entre el nivel inicial y el máximo.

10 Las células efectoras en un ensayo de citotoxicidad pueden ser *por ejemplo* células T positivas para CD8 enriquecidas (humanas) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) no estimuladas (humanas). Un valor de CE_{50} puede esperarse normalmente que sea menor cuando se usan células T CD8+ estimuladas / enriquecidas como células efectoras, en comparación con PBMC no estimuladas. Si las células diana son de origen de macaco o

15 expresan o se transfectan con CLDN18.2 de macaco, las células efectoras deben ser también de origen de macaco, tal como una línea de células T de macaco, por ejemplo 4119LnPx. Las células diana deben expresar CLDN18.2, tal como una CLDN18.2 humana o de macaco, en la superficie celular. Preferiblemente las células diana deben expresar al menos el/los bucle(s) extracelular(es) de CLDN18.2, tales bucle 1 y/o bucle 2 de CLDN18.2, en la superficie celular.

20 Las células diana puede ser una línea celular (tal como CHO) que se transfecta de manera estable o transitoria con CLDN18.2, por ejemplo CLDN18.2 humana o de macaco. Alternativamente, las células diana pueden ser una línea celular expresora natural positiva para CLDN18.2, tales como las líneas de cáncer gástrico humano SNU-601 o SNU-620, o también SNU-16, NUGC, NUG-C4, GSU o IM95. Habitualmente, se espera que los valores de

25 CE_{50} sean menores cuando se usan células diana que expresan niveles superiores de CLDN18.2 en la superficie celular en comparación con células diana que tiene una tasa de expresión de la diana inferior.

La razón de célula efectora con respecto a diana (E:T) en un ensayo de citotoxicidad es de manera habitual de aproximadamente 10:1, pero puede variar también. La actividad

30 citotóxica de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 puede medirse en un ensayo de liberación de cromo 51 (por ejemplo con un tiempo de incubación de aproximadamente 18 horas) o en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS (por ejemplo con un tiempo de incubación de aproximadamente 48 horas). También se prevén modificaciones del tiempo de incubación (reacción citotóxica). Otros métodos para medir la citotoxicidad se conocen bien y

35 comprenden ensayos MTT o MTS, ensayos basados en ATP que incluyen ensayos bioluminiscentes, el ensayo de sulforhodamina B (SRB), el ensayo WST, el ensayo clonogénico y la tecnología ECIS.

Según una realización, la actividad citotóxica mediada por los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la presente invención se mide en un ensayo de citotoxicidad basado en células. También se mide en un ensayo de liberación de cromo 51. Se prevé que los valores de CE_{50} de los constructos de anticuerpos de la invención sean ≤ 300 pM, ≤ 280 pM, ≤ 260 pM, ≤ 250 pM, ≤ 240 pM, ≤ 220 pM, ≤ 200 pM, ≤ 180 pM, ≤ 160 pM, ≤ 150 pM, ≤ 140 pM, ≤ 120 pM, ≤ 100 pM, ≤ 90 pM, ≤ 80 pM, ≤ 70 pM, ≤ 60 pM, ≤ 50 pM, ≤ 40 pM, ≤ 30 pM, ≤ 20 pM, ≤ 15 pM, ≤ 10 pM o ≤ 5 pM.

Los valores de CE_{50} facilitados anteriormente pueden medirse en diferentes ensayos y en diferentes condiciones. Por ejemplo, cuando se usan PBMC humanas como células efectoras y se usan células transfectadas con CLDN18.2 tales como células CHO como células diana, se prevé que el valor de CE_{50} del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 sea ≤ 500 pM, ≤ 400 pM, ≤ 300 pM, ≤ 280 pM, ≤ 260 pM, ≤ 250 pM, ≤ 240 pM, ≤ 220 pM, ≤ 200 pM, ≤ 180 pM, ≤ 160 pM, ≤ 150 pM, ≤ 140 pM, ≤ 120 pM, ≤ 100 pM, ≤ 90 pM, ≤ 80 pM, ≤ 70 pM, ≤ 60 pM, ≤ 50 pM, ≤ 40 pM, ≤ 30 pM, ≤ 20 pM, ≤ 15 pM, ≤ 10 pM o ≤ 5 pM. Cuando se usan PBMC humanas como células efectoras y cuando las células diana con una línea celular positiva para CLDN18.2 tal como SNU-601 o SNU-620, se prevé que el valor de CE_{50} del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 sea ≤ 300 pM, ≤ 280 pM, ≤ 260 pM, ≤ 250 pM, ≤ 240 pM, ≤ 220 pM, ≤ 200 pM, ≤ 180 pM, ≤ 160 pM, ≤ 150 pM, ≤ 140 pM, ≤ 120 pM, ≤ 100 pM, ≤ 90 pM, ≤ 80 pM, ≤ 70 pM, ≤ 60 pM, ≤ 50 pM, ≤ 40 pM, ≤ 30 pM, ≤ 20 pM, ≤ 15 pM, ≤ 10 pM o ≤ 5 pM.

Según una realización, los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la presente invención no inducen / median en la lisis o esencialmente no inducen / median en la lisis de células que no expresan CLDN18.2 en su superficie (células negativas para CLDN18.2), tales como células CHO. El término "no inducen lisis", "esencialmente no inducen lisis", "no median en la lisis" o "esencialmente no median en la lisis" significa que un constructo de anticuerpo de la presente invención no induce ni media en la lisis de más del 30%, preferiblemente no más del 20%, más preferiblemente no más del 10%, de manera particularmente preferible no más del 9%, el 8%, el 7%, el 6% o el 5% de células negativas para CLDN18.2, mediante lo cual la lisis de células diana que expresan CLDN18.2 (tales como células transformadas o transfectadas con CLDN18.2 o una línea celular expresora natural tal como las líneas de cáncer gástrico humano SNU-601 o SNU-620) se establece que es del 100%. Esto generalmente se aplica a concentraciones de construcción de anticuerpos de hasta 500 nM. La medición de la lisis celular es una técnica de rutina. Además, la presente memoria descriptiva indica instrucciones específicas sobre cómo medir la lisis celular.

La diferencia en la actividad citotóxica entre la isoforma monomérica y la dimérica de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 individuales se denomina "brecha de potencia". Esta brecha de potencia, p. ej., se puede calcular como una proporción entre los valores de CE_{50} de las formas monomérica y dimérica de la molécula. En un método para

determinar esta brecha, se lleva a cabo un ensayo de liberación de cromo 51 de 18 horas o un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 h tal como se describe más adelante en la presente (ejemplos 7.1 y 7.2) con monómero y dímero de constructo de anticuerpo purificado. Las células efectoras son células T CD8⁺ humanas enriquecidas estimuladas o PBMC humanas no estimuladas. Las células diana son células CHO transfectadas con CLDN18.2 hu. La razón de célula efectora con respecto a diana (E:T) es de 10:1. Las brechas de potencia de los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la presente invención son preferiblemente ≤ 5 , más preferiblemente ≤ 4 , incluso más preferiblemente ≤ 3 , incluso más preferiblemente ≤ 2 y lo más preferiblemente ≤ 1 .

El primer y/o el segundo dominio del constructo de anticuerpo de la invención es/son preferiblemente específico(s) de especie cruzada para miembros del orden de primates de mamíferos, tales como macacos. Los dominios de unión a CD3 específicos entre especies, por ejemplo, se describen en los documentos WO 2008/119567. Según una realización, el segundo dominio, además de unirse a CD3 humana, también se unirá a CD3 de primates incluyendo (pero sin limitarse a) primates del nuevo mundo (tales como *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* o *Saimiri sciureus*), primates del viejo mundo (tales como babuinos y macacos), gibones, orangutanes y *homininae* no humanos. Se prevé que el segundo dominio que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T también se una a al menos CD3 de macaco. Un macaco preferido es *Macaca fascicularis*. *Macaca mulatta* (Rhesus) también se prevé. Un constructo de anticuerpo de la invención comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T y al menos CD3 de macaco.

En una realización, la brecha de afinidad de los constructos de anticuerpos según la invención para la unión a CD3 de macaco frente a CD3 humana [KD ma CD3 : KD hu CD3] (tal como se determina *por ejemplo* mediante análisis de BiaCore o Scatchard) es de entre 0.01 y 100, preferiblemente entre 0.1 y 10, más preferiblemente entre 0.2 y 5, more preferiblemente entre 0.3 y 4, incluso más preferiblemente entre 0.5 y 3 o entre 0.5 y 2.5, y lo más preferiblemente entre 0.5 y 1. Véase el ejemplo 3.

El segundo dominio del constructo de anticuerpo de la invención se une a CD3. Más preferiblemente, se une a CD3 en la superficie de una célula T. Se prevé además que el segundo dominio se une a CD3 humana, preferiblemente a CD3 humana en la superficie de una célula T. También se prevé que el segundo dominio se una a CD3 épsilon. Más preferiblemente, se une a CD3 épsilon humana, por ejemplo a CD3 épsilon humana en la superficie de una célula T. Una secuencia de aminoácidos preferida para el dominio extracelular de CD3 épsilon humana se representa en SEQ ID NO: 256.

En una realización de la presente invención, el segundo dominio del constructo de anticuerpo se une a CD3 épsilon humana (o CD3 épsilon humana en la superficie de una

célula T) y a CD3 épsilon de *Callithrix jacchus* o *Saimiri sciureus*. También se prevé que el segundo dominio se una a un epítipo extracelular de CD3 épsilon, preferiblemente a un epítipo extracelular de CD3 épsilon humana. También se prevé que el segundo dominio se una a un epítipo extracelular de la cadena de CD3 épsilon humana y de *Macaca*. Un epítipo preferido de CD3 épsilon está comprendido dentro de los residuos de aminoácido 1-27 del dominio extracelular de CD3 épsilon humana (véase SEQ ID NO: 257). Incluso más específicamente, el epítipo comprende al menos la secuencia de aminoácidos Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* es un primate del nuevo mundo que pertenece a la familia de *Callitrichidae*, mientras que *Saimiri sciureus* es un primate del nuevo mundo que pertenece a la familia de *Cebidae*. Se describen agentes de unión que tienen tales características en detalle en el documento WO 2008/119567.

Se conocen en la técnica anticuerpos o constructos de anticuerpos biespecíficos dirigidos contra CD3 (humana) o específicamente contra CD3 épsilon, y sus secuencias de CDR, VH y VL pueden servir como base para el segundo dominio de unión del constructo de anticuerpo de la invención. Por ejemplo, Kung et al. notificaron en 1979 el desarrollo de OKT3 (Ortho Kung T3), el primer mAb que reconoce CD3 (específicamente, la cadena épsilon de CD3) en células T humanas. OKT3 (muromonab) fue el primer anticuerpo monoclonal de origen murino en estar disponible para terapia en seres humanos. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 más nuevos incluyen orelizumab (TRX4), teplizumab (MGA031), foralumab y visilizumab, seleccionando como diana todos la cadena épsilon de CD3. Están desarrollándose y sometiéndose a prueba de manera (pre)clínica también constructos de anticuerpos biespecíficos dirigidos contra una diana (cáncer) y CD3, y su dominio de unión a CD3 (CDR, VH, VL) puede servir como base para el segundo dominio de unión del constructo de anticuerpo de la invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Blinatumomab, Solitomab (MT110, AMG 110), Catumaxomab, Duvortuxizumab, Ertumaxomab, Mosunetuzumab, FBTA05 (Bi20, TPBs05), CEA-TCB (RG7802, RO6958688), AFM11 y MGD006 (S80880). Otros ejemplos de dominios de unión a CD3 se dan a conocer por ejemplo en los documentos US 7,994,289 B2, US 7,728,114 B2, US 7,381,803 B1, US 6,706,265 B1.

Se prevé para el constructo de anticuerpo de la presente invención que el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T comprenda una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionada de :

(a) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 37, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 38, y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 39;

(b) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 82, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 83, y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 84; y

(c) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 100, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 101, y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 102.

También se prevé para el constructo de anticuerpo de la presente invención que el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T comprenda una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionada de :

- 5 (a) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 31, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 32, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 33;
- (b) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 40, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 41, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 42;
- (c) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 49, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 50, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 51;
- 10 (d) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 58, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 59, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 60;
- (e) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 67, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 68, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 69;
- (f) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 76, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 77, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 78;
- 15 (g) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 85, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 86, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 87;
- (h) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 94, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 95, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 96;
- 20 (i) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 103, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 104, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 105; y
- (j) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 112, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 113, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 114.

Se prevé además para el constructo de anticuerpo de la presente invención que el segundo dominio que se une a CD3 comprenda una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 y una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 seleccionadas de:

- 25 (a) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 28, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 29, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 30, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 31, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 32, y
- 30 CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 33;
- (b) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 37, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 38, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 39, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 40, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 41, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 42;
- 35 (c) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 46, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 47, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 48, CDR-H1 tal

como se representa en SEQ ID NO: 49, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 50, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 51;

(d) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 55, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 56, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 57, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 58, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 59, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 60;

(e) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 64, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 65, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 66, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 67, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 68, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 69;

(f) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 73, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 74, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 75, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 76, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 77, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 78;

(g) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 82, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 83, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 84, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 85, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 86, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 87;

(h) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 91, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 92, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 93, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 94, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 95, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 96;

(i) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 100, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 101, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 102, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 103, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 104, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 105; y

(j) CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 109, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 110, CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 111, CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 112, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 113, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 114.

Se prevé para el constructo de anticuerpo de la presente invención que el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T comprenda una región VL seleccionada del grupo que consiste en una región VL tal como se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 234 y SEQ ID NO: 235.

También se prevé que el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T comprenda una región VH seleccionada del grupo que consiste en una región VH tal

como se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 236, SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238, SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 240, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 244, y SEQ ID NO: 245.

Más preferiblemente, el constructo de anticuerpo de la presente invención se caracteriza por el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T que comprende una región VL y una región VH seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 35 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 34 o 236;

(b) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 44 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 43 o 237;

(c) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 53 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 52 o 238;

(d) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 62 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 61 o 239;

(e) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 71 o 234 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 70 o 240;

(f) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 80 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 79 o 241;

(g) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 89 o 234 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 88 o 242;

(h) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 98 o 233 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 97 o 243;

(i) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 107 o 235 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 106 o 244;

(j) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 116 o 235 y una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 115 o 245; y

(k) una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 119 y una región VH tal como se ilustra en SEQ ID NO: 118.

Una realización preferida del constructo de anticuerpo descrito anteriormente de la presente invención se caracteriza por el segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 36, 45, 54, 63, 72, 81, 90, 99, 108, 117, 120, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254 y 255.

También se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los constructos de anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede que sea

deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la construcción de anticuerpos. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos de los constructos de anticuerpos mediante síntesis peptídica o introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en la molécula de ácido nucleico que codifica para los constructos de anticuerpos. Todas las modificaciones de secuencia de aminoácidos descritas a continuación deben dar como resultado un constructo de anticuerpo que retiene la actividad biológica deseada de la molécula original sin modificar (tal como unión a CLDN18.2 y a CD3, induciendo citotoxicidad contra células diana positivas para CLDN18.2).

El término "aminoácido" o "residuo de aminoácido" típicamente se refiere a un aminoácido que tiene su definición reconocida por la técnica tal como un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en: alanina (Ala o A), arginina (Arg o R), asparagina (Asn o N), ácido aspártico (Asp o D), cisteína (Cys o C), glutamina (Gln o Q), ácido glutámico (Glu o E), glicina (Gly o G), histidina (His o H); isoleucina (Ile o I), leucina (Leu o L), lisina (Lys o K), metionina (Met o M), fenilalanina (Phe o F), prolina (Pro o P), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), triptófano (Trp o W), tirosina (Tyr o Y) y valina (Val o V), aunque los aminoácidos modificados, sintéticos o poco comunes se pueden utilizar según se desee. Básicamente hay cuatro clases diferentes de aminoácidos determinados por diferentes cadenas laterales:

(1) apolar y neutros (no cargados): Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val

(2) polares y neutros (no cargados): Asn, Cys (que son sólo ligeramente polares), Gln, Ser, Thr, Trp (que son sólo ligeramente polares), Tyr

(3) ácidos y polares (cargados negativamente): Asp y Glu

(4) básicos y polares (cargados positivamente): Arg, His, Lys

Los aminoácidos hidrófobos pueden dividirse según si tienen cadenas laterales alifáticas o aromáticas. Phe y Trp (que son muy hidrófobos), Tyr y His (que son menos hidrófobos) se clasifican como aminoácidos aromáticos. En sentido estricto, alifático significa que las cadenas laterales contienen sólo átomos de hidrógeno y carbono. Mediante esta definición estricta, los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas son alanina, isoleucina, leucina (también norleucina), prolina y valina. La cadena lateral de la alanina, que es muy corta, significa que no es particularmente hidrófoba, y la prolina tiene una geometría poco común que le proporciona funciones especiales en proteínas. A menudo es conveniente considerar la metionina en la misma categoría que la isoleucina, leucina y valina, aunque también contiene un átomo de azufre. La cuestión unificante es que estos aminoácidos contienen en gran parte cadenas laterales flexibles y no reactivas. Los aminoácidos alanina, cisteína, glicina, prolina, serina y treonina se agrupan a menudo juntos por el motivo de que son todos de pequeño tamaño. Gly y Pro pueden influir en la orientación de la cadena.

Las modificaciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, delecciones de residuos de, inserciones de residuos en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de

aminoácidos de los constructos de anticuerpos. Cualquier combinación de delección, inserción y/o sustitución se hace para llegar a un constructo de anticuerpo final, siempre que el constructo final presente las características deseadas, *por ejemplo* la actividad biológica de la molécula original sin modificar (tal como unión a CLDN18.2 y a CD3, induciendo citotoxicidad contra células positivas para CLDN18.2). Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesamiento post-traduccionales de los constructos de anticuerpos, tal como mediante el cambio del número o posición de los sitios de glucosilación.

Por ejemplo, pueden insertarse, deleccionarse y/o sustituirse 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos en cada una de las CDR (por supuesto, dependiendo de su respectiva longitud), mientras que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 25 aminoácidos pueden insertarse, deleccionarse y/o sustituirse en cada una de las FR. Las inserciones de secuencia de aminoácidos también incluyen adiciones N-terminales y/o C-terminales de aminoácidos que oscilan en longitud por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos y polipéptidos que contienen más de 10, por ejemplo cien o más residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácido. Una variante de inserción del constructo de anticuerpo de la invención incluye la fusión de un polipéptido que aumenta o prolonga la semivida sérica del constructo de anticuerpo en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del constructo de anticuerpo. También es concebible que tal inserción se produzca dentro del constructo de anticuerpo, por ejemplo entre el primer y el segundo dominio.

Los sitios de mayor interés para modificaciones de aminoácidos, en particular para sustituciones de aminoácidos, incluyen las regiones hipervariables, en particular las CDR individuales de la cadena pesada y/o ligera, pero también se contemplan alteraciones de FR en la cadena pesada y/o ligera. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas tal como se describe en la presente. Preferiblemente, pueden sustituirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos en una CDR, mientras que pueden sustituirse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 25 aminoácidos en las regiones marco (FR), dependiendo de la longitud de la CDR o FR, respectivamente. Por ejemplo, si una secuencia de CDR abarca 6 aminoácidos, se contempla que uno, dos o tres de estos aminoácidos se sustituyen. De modo similar, si una secuencia de CDR abarca 15 aminoácidos, se contempla que uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de estos aminoácidos se sustituyen.

Un método útil para la identificación de determinados residuos o regiones dentro de los constructos de anticuerpos que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alaninas" y se describe *por ejemplo* en Cunningham B.C. y Wells J.A. (Science. 2 de junio de 1989; 244(4908):1081-5). En este caso, un residuo o grupo de residuos dentro del constructo de anticuerpo se identifican (*por ejemplo* residuos cargados tales como Arg, His, Lys, Asp y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o no polar (lo

más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción del/de los respectivo(s) aminoácido(s) con el epítipo de la proteína diana. El barrido de alaninas es una técnica usada para determinar la contribución de un residuo específico a la estabilidad o función de una proteína dada. Se utiliza la alanina debido a su grupo funcional metilo no voluminoso, químicamente inerte que, no obstante, imita las preferencias de estructura secundaria que muchos de los otros aminoácidos poseen. A veces, los aminoácidos voluminosos como la valina o la leucina se pueden utilizar en los casos en los cuales la conservación del tamaño de los residuos mutados se necesita. Esta técnica puede ser también útil para determinar si la cadena lateral de un residuo específico desempeña un papel significativo en la bioactividad. El barrido de alaninas se logra habitualmente mediante mutagénesis dirigida al sitio o al azar creando una biblioteca de PCR. Además, se han desarrollado métodos computacionales para estimar parámetros termodinámicos basándose en sustituciones de alaninas teóricas. Los datos pueden someterse a prueba mediante IR, espectroscopía de RMN, métodos matemáticos, bioensayos, etc.

Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones (tal como se determina *por ejemplo* mediante barrido de alaninas) puede refinarse entonces introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar u optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede llevar a cabo una determinación de alanina o mutación aleatoria en la región o codón diana y se analizan las variantes de la construcción de anticuerpos expresadas para determinar la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN con una secuencia conocida son conocidas, por ejemplo, mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis de PCR. El examen de mutantes se realiza por ejemplo usando ensayos de actividad de unión a antígeno (por ejemplo CLDN18.2 o CD3) y/o de actividad citotóxica.

Generalmente, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDR de la cadena pesada y/o ligera, se prevé que la secuencia "sustituida" obtenida en ese momento sea al menos un 60% o un 65%, más preferentemente un 70% o un 75%, incluso más preferentemente un 80% o un 85%, y particularmente preferentemente un 90% o un 95% idéntica / homóloga a la secuencia CDR "original" o "antecesora". Esto significa que el grado de identidad / homología entre la secuencia original y la sustituida depende de la longitud de la CDR. Por ejemplo, una CDR que tiene 5 aminoácidos en total y que comprende una sustitución de aminoácido es el 80% idéntica a la secuencia de CDR "original" o "antecesora", mientras que una CDR que tiene 10 aminoácidos en total y que comprende una sustitución de aminoácido es el 90% idéntica a la secuencia de CDR "original" o "antecesora". Por

consiguiente, las CDR sustituidas del constructo de anticuerpo de la invención pueden tener diferentes grados de identidad con sus secuencias originales, por ejemplo, CDRL1 puede tener el 80%, mientras que CDRL3 puede tener el 90% de homología. Las mismas consideraciones se aplican a las regiones marco y a las regiones VH y VL enteras.

5 Una "CDR variante" es una CDR con una homología, similitud o identidad de secuencia específica con la CDR antecesora de la invención, y comparte la función biológica con la CDR antecesora, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de la especificidad y/o actividad de la CDR antecesora.

10 Generalmente, la homología, similitud o identidad de aminoácidos entre CDR variantes individuales es de al menos el 60% con las secuencias antecesoras representadas en la presente, y más normalmente con homologías, similitudes o identidades crecientes de al menos el 65% o el 70%, preferiblemente al menos el 75% o el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, y lo más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%,

15 99%, y casi el 100%. Lo mismo se aplica a "VH variante" y "VL variante". Según una realización, las variaciones de secuencia dentro de una "VH variante" y/o a "VL variante" no se extienden a las CDR. La presente invención se refiere por tanto a un constructo de anticuerpo tal como se define en la presente, que comprende secuencias de VH y VL que tienen una determinada homología de secuencia (véase anteriormente) con las secuencias específicas

20 definidas en la presente (la VH y VL "antecesora"), en el que las secuencias de CDR son el 100% idénticas a las secuencias de CDR específicas definidas en la presente (las CDR "antecesoras").

Las sustituciones (o reemplazos) preferidas son las sustituciones conservadoras. Sin embargo, se prevé cualquier sustitución (incluyendo sustituciones no conservativas o una o

25 más de las "sustituciones a modo de ejemplo" enumeradas en la tabla 1, a continuación), siempre que el constructo de anticuerpo retenga su capacidad para unirse a CLDN18.2 por medio del primer dominio y a CD3 o CD3 épsilon por medio del segundo dominio, y/o siempre que sus secuencias de CDR, FR, VH y/o VL tengan un grado de identidad con la secuencia original o antecesora de al menos el 60% o el 65%, más preferiblemente al menos el 70% o el

30 75%, incluso más preferiblemente al menos el 80% o el 85%, y de manera particularmente preferible al menos el 90% o el 95%.

Un reemplazo conservativo (también denominado una mutación conservativa o una sustitución conservativa) es un reemplazo de aminoácido que cambia un aminoácido dado a un aminoácido diferente con propiedades bioquímicas similares (por ejemplo carga,

35 hidrofobicidad, tamaño). Los reemplazos conservativos en proteínas tienen a menudo un menor efecto sobre la función de la proteína que reemplazos no conservativos. Se muestran sustituciones conservativas en la tabla 1. Se muestran sustituciones conservativas a modo de

ejemplo como "sustituciones a modo de ejemplo". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, tal como se describe adicionalmente en la presente en referencia a clases de aminoácidos, y examinarse los productos para detectar una característica deseada.

5 **Tabla 1: Sustituciones de aminoácidos** (aa = aminoácido)

aa original	Sustituciones conservativas	Sustituciones a modo de ejemplo
Ala (A)	aa pequeño	Gly, Ser, Thr
Arg (R)	aa polar, en particular Lys	Lys, Gln, Asn
10 Asn (N)	aa polar, en particular Asp	Asp, Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu u otro aa polar, en particular Asn	Glu, Asn
Cys (C)	aa pequeño	Ser, Ala
Gln (Q)	aa polar, en particular Glu	Glu, Asn
Glu (E)	Asp u otro aa polar, en particular Gln	Asp, Gln
15 Gly (G)	aa pequeño, tal como Ala	Ala
His (H)		Asn, Gln, Arg, Lys, Tyr
Ile (I)	Hidrófobo, en particular aa alifático	Ala, Val, Met, Leu, Phe
Leu (L)	Hidrófobo, en particular aa alifático	Norleucina, Ile, Ala, Val, Met
Lys (K)	aa polar, en particular Arg	Arg, Gln, Asn
20 Met (M)	Hidrófobo, en particular aa alifático	Leu, Ala, Ile, Val, Phe
Phe (F)	aa aromático o hidrófobo, en particular Tyr	Tyr, Trp, Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	aa pequeño	Ala
Ser (S)	aa polar o pequeño, en particular Thr	Thr
25 Thr (T)	Polar aa, en particular Ser	Ser
Trp (W)	aa aromático	Tyr, Phe
Tyr (Y)	aa aromático, en particular Phe	Phe, Trp, Thr, Ser
Val (V)	Hidrófobo, en particular aa alifático	Leu, Ile, Ala, Met, Phe

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la construcción de anticuerpos de la presente invención se logran mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones no conservativas supondrán intercambiar un miembro de una de las clases de aminoácidos definidas anteriormente (tales como polar, neutra, ácida, básica, alifática, aromática, pequeña...) por otra clase. Se puede sustituir cualquier residuo de cisteína

no implicado en mantener la conformación adecuada de la construcción de anticuerpos, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa del constructo de anticuerpo.

La identidad, homología y/o similitud de secuencia de secuencias de aminoácidos se determina usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch (*J Mol Biol.* 1970 Mar;48(3):443-53), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (*Proc Natl Acad Sci USA.* abril de 1988; 85(8):2444-8), implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95), preferiblemente usando los parámetros por defecto, o mediante inspección. Se prevé que el porcentaje de identidad se calcule mediante FastDB basándose en los siguientes parámetros: penalización por apareamiento erróneo de 1; penalización por hueco de 1; penalización por tamaño de hueco de 0.33; y penalización por unión de 30. Véanse también "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, págs- 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de múltiples secuencias de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas, por pares. También puede representar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del método de la alineación progresiva de Feng y Doolittle (*J Mol Evol.* 1987;25(4):351-60); el método es similar al descrito por Higgins y Sharp (*Comput Appl Biosci.* abril de 1989; 5(2):151-3). Los parámetros de PILEUP útiles incluyen un peso de hueco por defecto de 3.00, un peso longitud de hueco por defecto de 0.10, y huecos finales ponderados.

Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul *et al.* (*J Mol Biol.* 5 de octubre de 1990; 215(3):403-10); Altschul *et al.*, (*Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 1997; 25(17):3389-402); y Karlin y Altschul (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de junio de 1993; 90(12):5873-7). Un programa de BLAST particularmente útil es el programa WU-Blast-2 que se obtuvo de Altschul *et al.*, (*Methods Enzymol.* 1996; 266:460-80). WU-Blast-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales están configurados con los valores por defecto. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: lapso de superposición=1; fracción de superposición=0.125, umbral de palabra (T)=II. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y se establecen por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de

datos particular en la que se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

Un algoritmo útil adicional es BLAST con huecos tal como notifican Altschul *et al.* (Nucleic Acids Res. 1 de septiembre de 1997; 25(17):3389-402). BLAST con huecos usa ponderaciones de sustitución BLOSUM-62; el parámetro T de umbral configurado en 9; el método de dos eventos para activar las extensiones sin huecos, carga las longitudes de los huecos de k una ponderación de $10+k$; Xu configurado en 16 y Xg configurado en 40 para la etapa de búsqueda en bases de datos y en 67 para la etapa de resultado de los algoritmos. Los alineamientos con huecos se activan mediante una ponderación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

En línea con la presente, el término "porcentaje (%) de identidad / homología / similitud" de la secuencia de ácido nucleico con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica para los constructos de anticuerpos identificados en la presente, se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de nucleótidos en la secuencia codificante del constructo de anticuerpo. Un método para alinear dos secuencias y de ese modo determinar su homología usa el módulo BLASTN de WU-Blast2 fijado a los parámetros por defecto, con la longitud de solapamiento y fracción de solapamiento fijados a 1 y 0.125, respectivamente. Generalmente, la homología, similitud o identidad de la secuencia de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótidos que codifican para CDR variantes individuales y las secuencias de nucleótidos representadas en la presente son de al menos del 60%, y más normalmente con homologías, similitudes o identidades crecientes de al menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, y casi el 100%. De nuevo, lo mismo se aplica a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la "VH variante" y/o "VL variante".

En una realización, el porcentaje de identidad con la línea germinal humana de los constructos de anticuerpos según la invención, o del primer y segundo domino (dominios de unión) de estos constructos de anticuerpos, es $\geq 70\%$ o $\geq 75\%$, más preferiblemente $\geq 80\%$ o $\geq 85\%$, incluso más preferiblemente $\geq 90\%$, y lo más preferiblemente $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ o incluso $\geq 96\%$. Se cree que la identidad con los productos génicos de la línea germinal de anticuerpos humana es una característica importante para reducir el riesgo de las proteínas terapéuticas de producir una respuesta inmunitaria contra el fármaco en el paciente durante el tratamiento. Hwang W.Y. y Foote J. (Methods. Mayo de 2005; 36(1):3-10) demuestran que la reducción de las porciones no humanas de constructos de anticuerpos frente a fármacos conduce a una disminución del riesgo de inducir anticuerpos anti-fármaco en los pacientes durante el tratamiento. Comparando un número exhaustivo de fármacos de anticuerpo evaluados clínicamente y los respectivos datos de inmunogenicidad, se muestra la

tendencia de que la humanización de las regiones variables de anticuerpos / constructos de anticuerpos hace que la proteína sea menos inmunogénica (promedio del 5.1 % de los pacientes) que anticuerpos / constructos de anticuerpos que portan regiones variables no humanas inalteradas (promedio del 23.59 % de los pacientes). Un mayor grado de identidad con secuencias humanas es por tanto deseable para productos terapéuticos proteicos basados en regiones variables y en forma de constructos de anticuerpos. Para el fin de determinar la identidad de la línea germinal, las regiones V de VL pueden alinearse con las secuencias de aminoácidos de segmentos V y segmentos J de línea germinal humana (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>) usando el software Vector NTI y calcularse la secuencia de aminoácidos dividiendo los residuos de aminoácido idénticos entre el número total de residuos de aminoácido de la VL en porcentaje. Lo mismo puede hacerse para los segmentos VH (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>) con la excepción de que puede excluirse VH CDR3 debido a su alta diversidad y una falta de parejas de alineación de VH CDR3 de línea germinal humana existentes. Se pueden utilizar técnicas recombinantes para aumentar la identidad de secuencia con los genes de las líneas germinales de anticuerpos humanas.

En una realización adicional, los constructos de anticuerpos de la presente invención exhiben altos rendimientos monoméricos en condiciones a escala de investigación estándar, p. ej., en un proceso de purificación de dos etapas estándar. Se prevé que el rendimiento monomérico de los constructos de anticuerpos según la invención sea ≥ 0.25 mg/L de sobrenadante (SN), preferiblemente ≥ 0.5 mg/L de SN, más preferiblemente ≥ 1 mg/L de SN, incluso más preferiblemente ≥ 2 mg/L de SN y lo más preferiblemente ≥ 3 mg/L de SN. El rendimiento del constructo de anticuerpo denominado "CL-1 x I2C-6His" se mostró que es de 4.1 mg/L de sobrenadante, y el rendimiento del constructo de anticuerpo denominado "CL-1 x I2C-scFc" se mostró que es de 36.5 mg/L de sobrenadante.

Asimismo, el rendimiento de las isoformas de constructos de anticuerpos diméricos y, por lo tanto, el porcentaje monomérico (es decir, monómero: (monómero+dímero)) de los constructos de anticuerpos se puede determinar. La productividad de los constructos de anticuerpos monoméricos y diméricos y el porcentaje monomérico calculado puede obtenerse, p. ej., en la etapa de purificación SEC del sobrenadante de cultivo a partir de la producción a escala de investigación estandarizada en botellas de rodillos. Según una realización, el porcentaje monomérico de los constructos de anticuerpos de la invención es $\geq 80\%$, más preferiblemente $\geq 85\%$, incluso más preferiblemente $\geq 90\%$ y lo más preferiblemente $\geq 95\%$.

Según una realización, los constructos de anticuerpos de la invención tienen una estabilidad en plasma (razón de CE_{50} con plasma con respecto a CE_{50} sin plasma) de ≤ 5 o ≤ 4 , más preferiblemente ≤ 3.5 o ≤ 3 , incluso más preferiblemente ≤ 2.5 o ≤ 2 , y lo más preferiblemente ≤ 1.5 o ≤ 1 . La estabilidad en plasma de un constructo de anticuerpo puede

someterse a prueba mediante incubación del constructo purificado en plasma humano a 37°C durante de 24 a 96 horas, *por ejemplo* a una concentración de 2-20 µg/ml, seguido por determinación de CE₅₀ en un ensayo de liberación de cromo 51 de 18 h o en un ensayo de citotoxicidad de FACS 48 h (ensayos por ejemplo tal como se describen en los ejemplos 7.1 y 7.2). Las células efectoras en el ensayo de citotoxicidad pueden ser células T positivas para CD8 humanas enriquecidas estimuladas (preferidas) o PBMC humanas no estimuladas. Las células diana pueden ser *por ejemplo* células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana. La razón de célula efectora con respecto a diana (E:T) puede ser de 10:1. La concentración de partida de los constructos de anticuerpos en el ensayo de citotoxicidad puede ser de 0.01-0.1 µg/ml. El grupo de plasma humano utilizado para este propósito se deriva de sangre de donantes sanos recolectada por jeringas recubiertas con EDTA. Los componentes celulares se eliminan por centrifugación y la fase plasmática superior se recoge y posteriormente se agrupa. Como control, se diluyen constructos de anticuerpos no incubados inmediatamente antes del ensayo de citotoxicidad en medio apropiado tal como RPMI-1640. La estabilidad en plasma se calcula como la razón de CE₅₀ (tras la incubación en plasma) con respecto a CE₅₀ (control / sin incubación).

Se prevé además que la conversión de monómero a dímero de los constructos de anticuerpos de la invención sea baja. La conversión se puede medir en diferentes condiciones y analizar mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento. Véase el ejemplo 8. Por ejemplo, la incubación de las formas monoméricas de los constructos de anticuerpos puede llevarse a cabo durante 7 días a 37°C en tampón de formulación genérico y a concentraciones de *por ejemplo* 100 µg/ml o 250 µg/ml en un incubador, seguido por SEC de alta resolución para determinar el porcentaje de constructo de anticuerpo inicialmente monomérico que se había convertido en constructo de anticuerpo dimérico. En estas condiciones, se prevé que los constructos de anticuerpos de la invención muestren un porcentaje de dímero que es ≤8%, preferiblemente ≤6%, más preferiblemente ≤5%, más preferiblemente ≤4%, incluso más preferiblemente ≤3%, incluso más preferiblemente ≤2.5%, incluso más preferiblemente ≤2%, incluso más preferiblemente ≤1.5% y lo más preferiblemente ≤1% o ≤0.5% o incluso el 0%.

Se prevé asimismo que los constructos de anticuerpos de la presente invención presenten una muy baja conversión en dímero tras varios ciclos de congelación/descongelación. Por ejemplo, el monómero de constructos de anticuerpos se ajusta a una concentración de 250 µg/mL, p. ej., en tampón de formulación genérica y se somete a tres ciclos de congelación/descongelación (congelación a -80 °C durante 30 min seguido de descongelación durante 30 min a temperatura ambiente), seguida de SEC de alta resolución para determinar el porcentaje de constructos de anticuerpos inicialmente monoméricos, que se había convertido en un constructo de anticuerpo dimérico. Se prevé que

los porcentajes de dímero de los constructos de anticuerpos sean $\leq 8\%$, preferiblemente $\leq 6\%$, más preferiblemente $\leq 5\%$, más preferiblemente $\leq 4\%$, incluso más preferiblemente $\leq 3\%$, incluso más preferiblemente $\leq 2.5\%$, incluso más preferiblemente $\leq 2\%$, incluso más preferiblemente $\leq 1.5\%$ y lo más preferiblemente $\leq 1\%$ o $\leq 0.5\%$ o incluso el 0%, por ejemplo tras tres ciclos de congelación/descongelación.

Según una realización, los constructos de anticuerpos de la presente invención muestran una termoestabilidad favorable con temperaturas de agregación $\geq 45^{\circ}\text{C}$ o $\geq 46^{\circ}\text{C}$, más preferiblemente $\geq 47^{\circ}\text{C}$ o $\geq 48^{\circ}\text{C}$, incluso más preferiblemente $\geq 49^{\circ}\text{C}$ o $\geq 50^{\circ}\text{C}$, y lo más preferiblemente $\geq 51^{\circ}\text{C}$. El parámetro de termoestabilidad puede determinarse en cuanto a la temperatura de agregación de anticuerpos tal como sigue: Se transfiere la disolución de anticuerpos a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$ a una cubeta de un solo uso y se coloca en un dispositivo de dispersión de luz dinámica (DLS). Se calienta la muestra de 40°C a 70°C a una velocidad de calentamiento de 0.5°C/min con adquisición constante del radio medido. El aumento del radio indica la fusión de la proteína y la acumulación se utiliza para calcular la temperatura de acumulación del anticuerpo. Véase el ejemplo 9.

Alternativamente, las curvas de fusión de temperatura pueden determinarse mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar las estabilidades proteicas biofísicas intrínsecas de los constructos de anticuerpos. Estos experimentos pueden realizarse usando un dispositivo MicroCal LLC VP-DSC. Se registra la absorción de energía de una muestra que contiene una construcción de anticuerpos de 20°C a 90°C en comparación con una muestra que contiene solo el tampón de la formulación. Los constructos de anticuerpos se ajustan a una concentración final de 250 $\mu\text{g/ml}$ *por ejemplo* en tampón de ejecución de SEC. Para registrar la curva de fusión respectiva, la temperatura general de la muestra se aumenta progresivamente. La captación de energía de la muestra y la referencia de tampón de formulación se registra a cada temperatura. La diferencia en la absorción de energía C_p ($\text{kcal/mol}^{\circ}\text{C}$) de la muestra menos la referencia se representa en un gráfico con respecto a la temperatura respectiva. La temperatura de fusión se define como la temperatura en el primer máximo de absorción de energía.

Los constructos de anticuerpos de la invención se prevé también que tengan una turbidez de ≤ 0.2 o ≤ 0.15 , preferiblemente de ≤ 0.10 o ≤ 0.08 , más preferiblemente de ≤ 0.06 o ≤ 0.05 , y lo más preferiblemente de ≤ 0.04 o ≤ 0.03 . La turbidez puede medirse mediante OD340 a una concentración del constructo de anticuerpo de 2.5 mg/ml y 16 h de incubación a 5°C . Véase el ejemplo 10.

Pueden medirse cambios en la potencia de un constructo de anticuerpo frente a diana x CD3 como una función de la preincubación del constructo en las células diana en ausencia de células T. Si se internaliza un constructo de anticuerpo, se espera que experimente degradación lisosomal. Se espera por tanto que la concentración eficaz disminuya a lo largo

del tiempo, y por tanto la potencia aparente debe disminuir también. El efecto se ha observado con algunas dianas, para las que esto es un fenómeno conocido. Se prevé que los constructos de anticuerpos de la invención no se internalicen o no experimenten una internalización significativa por la célula diana. La tasa de internalización puede someterse a ensayo *por ejemplo* tal como se describe a continuación: Se cuentan las células T y se diluyen a una concentración de 1×10^5 / ml en medio de ensayo. Se cuentan las células diana positivas para la diana y se siembran en placa *por ejemplo* a 2500 células por pocillo (cpw). El constructo de anticuerpo se diluye en serie 1:2, *por ejemplo* a una concentración de partida de 100 nM. El constructo de anticuerpo se añade a las placas de ensayo de cultivo para permitir 0 horas, 1 hora o 2 horas de incubación antes de la adición de las células T. Entonces se siembran en placa las células T a 25000 cpw (E:T = 10:1), y se incuba el ensayo durante 48 horas a 37°C. Se analiza la supervivencia de células diana *por ejemplo* con el sistema Steady-Glo® (25 µl/pocillo). Preferiblemente, la tasa de internalización (*por ejemplo* medida como una disminución en la citotoxicidad) es $\leq 20\%$ tras una (pre-)incubación de 2 h del constructo de anticuerpo con la célula diana, más preferiblemente $\leq 15\%$, incluso más preferiblemente $\leq 10\%$, y lo más preferiblemente $\leq 5\%$.

Se prevé además para un constructo de anticuerpo de la invención que la diana desprendida o soluble no altere significativamente su eficacia o actividad biológica. Esto puede medirse *por ejemplo* en un ensayo de citotoxicidad en el que se añade diana soluble a concentraciones crecientes al ensayo, *por ejemplo* a 0 nM – 0.3 nM – 0.7 nM – 1 nM – 3 nM – 7 nM – 12 nM. Un valor de E:T a modo de ejemplo es 10:1. El valor de CE₅₀ del constructo de anticuerpo sometido a prueba no debe aumentar significativamente en presencia de diana soluble.

En una realización adicional, el constructo de anticuerpo según la invención es estable a pH ácido. Cuanto más tolerante se comporte el constructo de anticuerpo a un pH no fisiológico tal como pH 5.5 (un pH que se requiere para ejecutar, p. ej., una cromatografía de intercambio catiónico), mayor será la recuperación del constructo de anticuerpo eluido de una columna de intercambio iónico con respecto a la cantidad total de proteína cargada. La recuperación del constructo de anticuerpo de una columna de intercambio iónico (*por ejemplo*, catiónico) a pH 5.5 es preferiblemente $\geq 30\%$, más preferiblemente $\geq 40\%$, más preferiblemente $\geq 50\%$, incluso más preferiblemente $\geq 60\%$, incluso más preferiblemente $\geq 70\%$, incluso más preferiblemente $\geq 80\%$, y lo más preferiblemente $\geq 95\%$. El porcentaje representa el área bajo la curva (= AUC) del pico principal. Véase el ejemplo 11.

Se prevé además que los constructos de anticuerpos de la presente invención presenten eficacia terapéutica, que se manifiesta como actividad antitumoral o inhibición del crecimiento tumoral. Esto puede evaluarse *por ejemplo* en un estudio tal como se da a conocer en el ejemplo 13 o 14. En una realización, la inhibición del crecimiento tumoral del

constructo de anticuerpo de la invención T/C [%] es ≤ 70 , ≤ 60 , ≤ 50 , ≤ 40 , ≤ 30 , ≤ 20 , ≤ 10 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , o ≤ 2 . La modificación o el ajuste de determinados parámetros de estos estudios (tales como el número de células tumorales inyectadas, el sitio de inyección, el número de células T humanas trasplantadas, la cantidad de constructo de anticuerpos que va a administrarse y los plazos) también se prevé, al tiempo que se llega todavía a un resultado significativo y reproducible.

La invención además proporciona una molécula de polinucleótido/ácido nucleico codificante de una construcción de anticuerpos de la invención. Las moléculas de ácido nucleico son biopolímeros compuestos por nucleótidos. Un polinucleótido es un biopolímero compuesto por 13 o más monómeros de nucleótidos unidos por enlace covalente en una cadena. El ADN (tal como ADNc) y el ARN (tal como ARNm) son ejemplos de polinucleótidos / moléculas de ácido nucleico con una función biológica diferente. Los nucleótidos son moléculas orgánicas que sirven como monómeros o subunidades de moléculas de ácido nucleico como ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico o polinucleótido de la presente invención puede ser bicatenaria, monocatenaria, lineal o circular. Se prevé que la molécula de ácido nucleico o polinucleótido esté comprendida en un vector. Se prevé además que tal vector esté comprendido en una célula huésped. Dicha célula huésped es, *por ejemplo* tras la transformación o transfección con el vector o el polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la invención, capaz de expresar el constructo de anticuerpo. Para este propósito, el polinucleótido o molécula de ácido nucleico está operativamente unido con secuencias de control.

El código genético es el conjunto de reglas a través de las cuales la información codificada dentro del material genético (ácidos nucleicos) se traduce a las proteínas. La descodificación biológica en las células vivas es realizada por el ribosoma que une los aminoácidos en un orden especificado por el ARNm, utilizando moléculas de ARNt para transportar los aminoácidos y leer los tres nucleótidos del ARNm a la vez. El código define cómo las secuencias de estos tripletes de nucleótidos, llamados codones, especifican qué aminoácido se agregará a continuación durante la síntesis de las proteínas. Con algunas excepciones, un codón de tres nucleótidos en una secuencia de ácido nucleico especifica un solo aminoácido. Como la gran mayoría de los genes están codificados con el mismo código, este código particular se suele denominar código genético canónico o estándar.

La degeneración de los codones es la redundancia del código genético, presentada como la multiplicidad de combinaciones de codones de tres pares de bases que especifican un aminoácido. La degeneración resulta porque hay más codones que aminoácidos codificables. Los codones que codifican para un aminoácido pueden diferir en cualquiera de sus tres posiciones; sin embargo, más frecuentemente que no, esta diferencia está en la segunda o tercera posición. Por ejemplo, los codones GAA y GAG especifican ambos ácido

glutámico y presentan redundancia; pero ninguno especifica cualquier otro aminoácido y por tanto no demuestran ambigüedad. Los códigos genéticos de diferentes organismos pueden desviarse hacia el uso de uno de los varios codones que codifican para el mismo aminoácido con respecto a los otros, es decir, se encontrará una mayor frecuencia de uno que lo esperado por casualidad. Por ejemplo, seis codones distintos especifican leucina, algunos de los cuales se usan raramente. Están disponibles tablas de uso de codones que detallan las frecuencias de uso de codones genómicos para la mayoría de los organismos. Las tecnologías genéticas recombinantes se aprovechan comúnmente de este efecto implementando una técnica denominada optimización de codones, en la que los codones se usan para diseñar un polinucleótido que prefiere la célula huésped respectiva (tal como una célula de origen de hámster humana, una célula de *Escherichia coli* o una célula de *Saccharomyces cerevisiae*), por ejemplo con el fin de aumentar la expresión de proteínas. Se prevé por tanto que los polinucleótidos / moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación tengan codones optimizados. No obstante, el polinucleótido / molécula de ácido nucleico que codifica para un constructo de anticuerpo de la invención puede diseñarse usando cualquier codón que codifique para el aminoácido deseado.

Según una realización, el polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica para el constructo de anticuerpo de la invención está en forma de una única molécula o en forma de dos o más moléculas separadas. Si el constructo de anticuerpo de la presente invención es un constructo de anticuerpo de cadena sencilla, el polinucleótido / molécula de ácido nucleico que codifica para tal constructo estará lo más probablemente en forma de una única molécula. Sin embargo, también se prevé que diferentes componentes del constructo de anticuerpo (tal como diferentes dominios, por ejemplo el dominio que se une a CLDN18.2, el dominio que se une a CD3 y/o dominios adicionales tales como dominios constantes de anticuerpos) estén ubicados en cadenas polipeptídicas separadas, en cuyo caso el polinucleótido / molécula de ácido nucleico está lo más probablemente en forma de dos o más moléculas separadas.

Lo mismo se aplica para el vector que comprende un polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la presente invención. Si el constructo de anticuerpo de la presente invención es un constructo de anticuerpo de cadena sencilla, un vector puede comprender el polinucleótido que codifica para el constructo de anticuerpo en una única ubicación (tal como un único marco de lectura abierto, ORF). Un vector puede comprender también dos o más polinucleótidos / moléculas de ácido nucleico en ubicaciones separadas (con ORF individuales), codificando cada uno de ellos para un componente diferente del constructo de anticuerpo de la invención. Se prevé que el vector que comprende el polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la presente invención esté en forma de un único vector o dos o más vectores separados. En una realización, y para el propósito de expresar el constructo de

anticuerpo en una célula huésped, la célula huésped de la invención debe comprender el polinucleótido / molécula de ácido nucleico que codifica par el constructo de anticuerpo o el vector que comprende tal polinucleótido / molécula de ácido nucleico en su totalidad, lo que significa que todos los componentes del constructo de anticuerpo, ya estén codificados como una única molécula o en moléculas / ubicaciones separadas, se ensamblarán tras la traducción y formarán juntos el constructo de anticuerpo biológicamente activo de la invención.

La invención también proporciona un vector que comprende un polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la invención. Un vector es una molécula de ácido nucleico usada como vehículo para transferir material genético (foráneo) dentro de una célula, habitualmente para el propósito de replicación y/o expresión. El término "vector" abarca, pero no se restringe a, plásmidos, virus, cósmidos y cromosomas artificiales. Algunos vectores se diseñan específicamente para clonar (vectores de clonación), otros para expresión de proteínas (vectores de expresión). Los denominados vectores de transcripción se usan principalmente para amplificar su inserto. La manipulación de ADN se realiza normalmente en vectores de *E. coli*, que contienen elementos necesarios para su mantenimiento en *E. coli*. Sin embargo, los vectores pueden tener también elementos que les permiten mantenerse en otro organismo tal como células de levadura, vegetales o de mamífero, y estos vectores se denominan vectores lanzadera. La inserción de un vector en la célula huésped o diana se denomina habitualmente transformación para células bacterianas y transfección para células eucariotas, mientras que la inserción de un vector viral se denomina a menudo transducción.

En general, los vectores modificados genéticamente comprenden un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador seleccionable. El propio vector es generalmente una secuencia de nucleótidos, comúnmente una secuencia de ADN que comprende un inserto (transgén) y una secuencia mayor que sirve como la "estructura principal" del vector. Aunque el código genético determina la secuencia de polipéptidos para una región codificante determinada, otras regiones genómicas pueden afectar el momento y el lugar en que se producen estos polipéptidos. Los vectores modernos pueden abarcar por tanto otras características además del inserto de transgén y una estructura principal: promotor, marcador genético, resistencia a antibióticos, gen indicador, secuencia de direccionamiento, marcador de purificación de proteínas. Los vectores denominados vectores de expresión (constructos de expresión) son específicamente para la expresión del transgén en la célula diana y generalmente tienen secuencias de control.

La expresión "secuencias de control" hace referencia a secuencias de ADN necesarias para expresar una secuencia codificante enlazada de forma operativa en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al

ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, una secuencia Kozak y potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está ubicada de modo que facilite la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de nucleótidos que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La "transfección" es el proceso de introducir deliberadamente moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluidos vectores) en las células diana. El término se utiliza mayoritariamente para los métodos no virales en las células eucariotas. La transducción se suele utilizar para describir la transferencia mediada por virus de las moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos. La transfección de células animales comprende típicamente la abertura de poros transitorios u "orificios" en la membrana celular para permitir la absorción de material. La transfección puede llevarse a cabo usando partículas biológicas (tales como transfección viral, también denominada transducción viral), métodos de base química (tales como el uso de fosfato de calcio, lipofección, Eugene, polímeros catiónicos, nanopartículas) o tratamiento físico (tal como electroporación, microinyección, pistola génica, compresión celular, magnetofección, presión hidrostática, impalefacción, sonicación, transfección óptica, choque térmico).

El término "transformación" se utiliza para describir la transferencia no viral de las moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos (incluidos vectores) en las bacterias y también en las células eucariotas no animales, incluidas las células de plantas. Por lo tanto, la transformación es la alteración genética de una célula bacteriana o eucariota no animal producto de la absorción directa a través de la(s) membrana(s) celular(es) de su entorno y la incorporación posterior del material genético exógeno (moléculas de ácido nucleico). La transformación puede efectuarse por medios artificiales. Para que se produzca la transformación, las células o las bacterias deben estar en un estado de competencia, lo que podría producirse como una respuesta limitada en el tiempo a condiciones ambientales tales como la inanición y la densidad celular, y también pueden inducirse artificialmente.

Además, la invención proporciona una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido / molécula de ácido nucleico de la invención o el vector de la invención.

Tal como se usan en la presente, los términos "célula huésped" o "célula receptora" pretenden incluir cualquier célula o cultivo celular individual que puede ser o ha sido el receptor de vectores, moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos exógenos que codifican para el constructo de anticuerpo de la presente invención; y/o receptores de los propios constructos de anticuerpos. La introducción del material respectivo en la célula se lleva a cabo por medio de transformación, transfección y similares (véase anteriormente). La expresión "célula huésped" también incluye la progenie o la posible progenie de una célula única. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas ocasionadas por mutaciones naturales, accidentales o deliberadas o debido a la influencia ambiental, dicha progenie puede, de hecho, no ser completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total o genómico) a la célula parental, pero igualmente estar incluida dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento. Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas o eucariotas, y también incluyen, entre otros, bacterias (tales como *E. coli*), células de levadura, células de hongos, células vegetales y células animales tales como células de insectos y de mamíferos, p. ej., hámster, murinas, de rata, macaco o ser humano.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como la levadura u hongos filamentosos son huéspedes de clonación o expresión para la construcción de anticuerpos de la invención. *Saccharomyces cerevisiae* o la levadura de cerveza común es el utilizado más comúnmente entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, se encuentra comúnmente disponible una variedad de otros géneros, especies y cepas y son útiles en la presente, tales como *Schizosaccharomyces pombe*, huéspedes de *Kluyveromyces* tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402 226); *Pichia pastoris* (documento EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tal como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de un constructo de anticuerpo glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insectos permisivos correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección se encuentran públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de

Autographa californica NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden utilizar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos celulares de plantas de algodón, trigo, papa, soja, petunia, tomate, Arabidopsis y tabaco, también pueden usarse como huéspedes. Los expertos en la técnica conocen los vectores de clonación y expresión útiles en la producción de proteínas en cultivos celulares de plantas. Véase, p. ej., Hiatt *et al.*, Nature (1989) 342: 76-78, Owen *et al.* (1992) Bio/Technology 10: 790-794, Artsaenko *et al.* (1995) The Plant J 8: 745-750, y Fecker *et al.* (1996) Plant Mol Biol 32: 979-986.

Sin embargo, existe un mayor interés en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo celular) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (tales como COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionaria humana (tales como 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36 : 59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (tales como BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (tales como CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (tales como TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (tales como CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (tales como VERO-76, ATCC CRL1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (tales como HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (tales como MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (tales como BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (tales como W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (tales como Hep G2, 1413 8065); tumor mamario de ratón (tales como MMT 060562, ATCC CCL-51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); células MRC 5; células de FS4; y una línea de hepatoma humana (tal como Hep G2).

En otra realización, la invención proporciona un proceso para la producción de un constructo de anticuerpo de la invención, en donde dicho proceso comprende cultivar una célula huésped de la invención en condiciones que permitan la expresión del constructo de anticuerpo de la invención y recuperar el constructo de anticuerpo producido del cultivo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cultivar" se refiere al mantenimiento *in vitro*, diferenciación, crecimiento, proliferación y/o propagación de células en condiciones adecuadas en un medio. Las células se hacen crecer y se mantienen en un medio de crecimiento celular a una temperatura y mezcla de gases apropiados. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo de célula. Condiciones de crecimiento típicas son una temperatura de aproximadamente 37°C, una concentración de CO₂ de aproximadamente el 5% y una humedad de aproximadamente el 95%. Las recetas para medios de crecimiento

pueden variar, por ejemplo, en pH, concentración de la fuente de carbono (tal como glucosa), naturaleza y concentración de factores de crecimiento, y la presencia de otros nutrientes (tales como aminoácidos o vitaminas). Los factores de crecimiento usados para complementar medios se derivan a menudo del suero de la sangre animal, tal como suero bovino fetal (FBS),
5 suero de ternero bovino (FCS), suero equino y suero porcino. Las células pueden hacerse crecer o bien en suspensión o bien como cultivos adherentes. Hay también líneas celulares que se han modificado para poder sobrevivir en cultivos en suspensión de modo que pueden hacerse crecer hasta una mayor densidad que la que permitirían condiciones adherentes.

El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un
10 constructo de anticuerpo de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, plegamiento, modificación postraducciona, direccionamiento a ubicaciones subcelulares o extracelulares específicas y secreción. El término "recuperación" se refiere a una serie de procesos destinados a aislar el constructo de anticuerpo del cultivo celular. El proceso de "recuperación" o "purificación" puede separar las
15 partes proteicas y no proteicas del cultivo celular, y finalmente separar el constructo de anticuerpo deseado de todos los demás polipéptidos y proteínas. Las etapas de separación se aprovechan habitualmente de diferencias en el tamaño de las proteínas, propiedades fisicoquímicas, afinidad de unión y actividad biológica. Las purificaciones preparativas se dirigen a producir una cantidad relativamente grande de proteínas purificadas para su uso
20 posterior, mientras que la purificación analítica produce una cantidad relativamente pequeña de proteína para una variedad de propósitos de investigación o analíticos.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, la construcción de anticuerpos se puede producir de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o segregar directamente en el medio. Si la construcción de anticuerpos se produce de forma intracelular, como una primera
25 etapa, los residuos de particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se quitan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. El constructo de anticuerpo de la invención puede producirse por ejemplo en bacterias tales como *E. coli*. Tras la expresión, el constructo se aísla de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse por ejemplo por medio de cromatografía de afinidad y/o de exclusión molecular. La purificación
30 final puede llevarse a cabo de una manera similar al proceso para purificar un constructo de anticuerpo expresado en células de mamífero y secretado al medio. Carter *et al.* (Biotechnology (NY) febrero de 1992; 10(2):163-7) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*.

Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas
35 de expresión se concentran generalmente en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración.

El constructo de anticuerpo de la invención preparada a partir de las células huésped se puede recuperar o purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía por afinidad. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, intercambio iónico en modo mixto, HIC, precipitación con etanol, cromatografía de exclusión molecular, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina sepharose, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliacido aspártico), cromatografía de inmutafinidad (tal como proteína A/G/L), cromatofenofue, SDS-PAGE, ultracentrifugación y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del constructo de anticuerpo que va a recuperarse.

Se puede incluir un inhibidor de la proteasa en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes.

Además, la invención proporciona una composición o formulación farmacéutica que comprende un constructo de anticuerpo de la invención o un constructo de anticuerpo producido de acuerdo con el proceso de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se relaciona con una composición que es adecuada para la administración a un paciente, preferentemente a un paciente humano. La composición farmacéutica particularmente preferida de la presente invención comprende una o múltiples constructos de anticuerpos de la invención, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Preferentemente, la composición farmacéutica además comprende formulaciones adecuadas de uno o más portadores, estabilizantes, excipientes, diluyentes, solubilizantes, tensioactivos, emulsionantes, conservantes y/o adyuvantes (farmacéuticamente eficaces). Preferentemente, los constituyentes aceptables de la composición no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica de la invención incluye, pero no se limita a, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

Las composiciones pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable. En general, tal como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier solución acuosa y no acuosa, soluciones estériles, disolventes, amortiguadores, p. ej., soluciones salinas amortiguadas con fosfato (PBS), agua, suspensiones, emulsiones, como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, liposomas, medios de dispersión y recubrimientos, que son compatibles con la administración farmacéutica, en particular con la administración parenteral. El uso de dichos medios y agentes en las composiciones farmacéuticas es conocido en la técnica y las

composiciones que comprenden dichos portadores se pueden formular mediante métodos convencionales conocidos.

Determinadas realizaciones proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el constructo de anticuerpo de la invención y además uno o más excipientes como los que se describen de forma ilustrativa en esta sección y en otras partes de la presente. Pueden usarse excipientes en la invención para una amplia variedad de fines, tales como el ajuste de las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tal como el ajuste de la viscosidad, y o procesos de la invención para mejorar la eficacia y/o estabilizar tales formulaciones y procesos contra la degradación y el deterioro, por ejemplo, debidos a tensiones que se producen durante la fabricación, envío, almacenamiento, preparación antes del uso, administración y después de eso. Los excipientes deben usarse en general en sus concentraciones eficaces más bajas.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para el fin de modificar, mantener o conservar determinadas características de la composición tales como pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, 1990, Mack Publishing Company). En dichas realizaciones, los materiales de formulación adecuados pueden incluir, entre otros:

- Aminoácidos
- Antimicrobianos tales como agentes antibacterianos y antifúngicos
- Antioxidantes
- Tampones, sistemas de tampón y agentes tamponantes que se usan para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8 o 9
- Disolventes no acuosos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables
- Portadores acuosos incluyendo agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados
- Polímeros biodegradables tales como poliésteres
- Agentes de carga
- Agentes quelantes
- Agentes de retardo de la absorción y isotónicos
- Agentes complejantes
- Cargas
- hidratos de carbono

• Proteínas (de bajo peso molecular), polipéptidos o portadores proteínicos, preferiblemente de origen humano

- Agentes colorantes y aromatizantes
- Agentes reductores que contienen azufre
- 5 • Agentes diluyentes
- Agentes emulsionantes
- Polímeros hidrófilos
- Contraiones formadores de sal
- 10 • Conservantes
- Complejos de metal
- Disolventes y codisolventes
- Azúcares y alcoholes de azúcar
- Agentes de suspensión
- 15 • Tensioactivos o agentes humectantes
- Agentes potenciadores de la estabilidad
- Agentes potenciadores de la tonicidad
- vehículos de suministro parenterales
- 20 • vehículos de suministro intravenosos

Es conocimiento común que los diferentes constituyentes de la composición farmacéutica puedan tener diferentes efectos, por ejemplo, y un aminoácido puede actuar como tampón, estabilizador y/o antioxidante; el manitol puede actuar como agente de carga y/o agente potenciador de la tonicidad; el cloruro de sodio puede actuar como vehículo de suministro y/o agente potenciador de la tonicidad; etc.

En el contexto de la presente invención, una composición farmacéutica puede comprender:

- (a) un constructo de anticuerpo tal como se describe en la presente,
- (b) al menos un agente de tampón,
- 30 (c) al menos un sacárido, y
- (d) al menos un tensioactivo;

en donde el pH de la composición farmacéutica se encuentra en el intervalo de entre 3.5 y 6.

En la composición descrita anteriormente, el primer dominio tiene preferiblemente un punto isoelectrico (pI) en el intervalo de 4 a 9.5; el segundo dominio tiene un pI en el intervalo de 8 a 10, preferiblemente de 8.5 a 9.0; y el constructo de anticuerpo comprende opcionalmente un tercer dominio que comprende dos monómeros de polipéptido,

comprendiendo cada uno una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, en la que dichos dos monómeros de polipéptido se fusionan entre sí por medio de un ligador peptídico;

En la composición descrita anteriormente, se prevé además que al menos un agente de tampón esté presente a un intervalo de concentración de 5 a 200 mM, más preferiblemente a un intervalo de concentración de 10 a 50 mM. También se prevé que el al menos un sacárido se seleccione del grupo que consiste en monosacárido, disacárido, polisacárido cíclico, alcohol de azúcar, dextrano ramificado lineal o dextrano no ramificado lineal. También se prevé que el disacárido se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa y manitol, sorbitol, y combinaciones de los mismos. También se prevé que el alcohol de azúcar sea sorbitol. También se prevé que el al menos un sacárido esté presente a una concentración en el intervalo del 1 al 15% (m/V), preferiblemente en un intervalo de concentración del 9 al 12% (m/V). Se prevé además que el constructo de anticuerpo esté presente en un intervalo de concentración de 0.1 a 8 mg/ml, preferiblemente de 0.2-2.5 mg/ml, más preferiblemente de 0.25-1.0 mg/ml.

Según una realización de la composición descrita anteriormente, el al menos un tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, poloxámero 188, pluronic F68, triton X-100, polioxietileno, PEG 3350, PEG 4000 y combinaciones de los mismos. Se prevé además que el al menos un tensioactivo esté presente en una concentración en el intervalo del 0.004 al 0.5 % (m/V), preferiblemente en el intervalo del 0.001 al 0.01% (m/V). Se prevé que el pH de la composición esté en el intervalo de 4.0 a 5.0, preferiblemente 4.2. También se prevé que la composición farmacéutica tenga una osmolaridad en el intervalo de 150 a 500 mOsm. Se prevé además que la composición farmacéutica comprenda además un excipiente seleccionado del grupo que consiste en uno o más poliol(es) y uno o más aminoácido(s). Se contempla en el contexto de la presente invención que dicho uno o más excipientes están presentes en el intervalo de concentración del 0.1 al 15 % (p/V).

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende

(a) el constructo de anticuerpo tal como se describe en la presente, preferiblemente en un intervalo de concentración de 0.1 a 8 mg/ml, preferiblemente de 0.2-2.5 mg/ml, más preferiblemente de 0.25-1.0 mg/ml;

(b) glutamato o acetato 10 mM;

(c) sacarosa al 9% (m/V) o sacarosa al 6% (m/V) e hidroxipropil- β -ciclodextrina al 6% (m/V);

(d) polisorbato 80 al 0.01% (m/V);

en la que el pH de la composición farmacéutica líquida es de 4.2.

Se prevé que la composición de la invención pueda comprender, además del constructo de anticuerpo de la invención definida en la presente, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición. Dichos agentes pueden ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben las inmunoreacciones, fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidas en la técnica. También se prevé que el constructo de anticuerpo de la presente invención se aplique en una coterapia, es decir, en combinación con otro medicamento contra el cáncer.

En este contexto, se prevé que la composición farmacéutica de la invención (que comprende un constructo de anticuerpo que comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T, tal como se describe en más detalle en la presente anteriormente) comprenda además un agente, preferiblemente un anticuerpo o constructo de anticuerpo, que se une a una proteína de la ruta de punto de control inmunitario (tal como PD-1 o CTLA-4) o a un receptor de punto de control inmunitario coestimulador (tal como 4-1BB). La presente invención también se refiere a una combinación de un constructo de anticuerpo según la invención (que comprende un constructo de anticuerpo que comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T, tal como se describe en más detalle en la presente anteriormente) y un agente, preferiblemente un anticuerpo o constructo de anticuerpo, que se une a una proteína de la ruta de punto de control inmunitario (tal como PD-1 o CTLA-4) o a un receptor de punto de control inmunitario coestimulador (tal como 4-1BB). Debido a la naturaleza de los al menos dos componentes de la combinación, concretamente su actividad farmacéutica, la combinación puede denominarse también combinación terapéutica. En algunas realizaciones, la combinación puede estar en forma de una composición farmacéutica o de un kit. Según una realización, la composición o combinación farmacéutica comprende un constructo de anticuerpo de la invención y un anticuerpo o constructo de anticuerpo que se une a PD-1. Se describen en detalle por ejemplo proteínas de anti-PD-1 útiles para este propósito en el documento PCT/US2019/013205.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o a una combinación que comprende:

- un constructo de anticuerpo que comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T, tal como se describe en más detalle anteriormente en la presente, y
- un anticuerpo o constructo de anticuerpo que se une a PD-1 y comprende:

a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 292, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 293, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 294, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 295, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 296 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 297;

b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 302, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 303, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 304, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 305, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 306 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 307;

c) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 312, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 313, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 314, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 315, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 316 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 317;

d) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 322, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 323, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 324, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 325, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 326 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 327;

e) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 332, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 333, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 334, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 335, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 336 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 337;

f) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 342, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 343, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 344, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 345, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 346 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 347;

g) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 352, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 353, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 354, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 355, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 356 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 357; o

h) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 362, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 363, y CDR-H3 tal como se

representa en SEQ ID NO: 364, y/o una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 365, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 366 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 367.

En una realización, el anticuerpo o constructo de anticuerpo descrito anteriormente que se une a PD-1 comprende

a) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 298, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 299;

b) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 308, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 309;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 318, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 319;

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 328, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 329;

e) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 338, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 339;

f) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 348, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 349;

g) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 358, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 359; o

h) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 368, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 369.

En una realización, el anticuerpo o constructo de anticuerpo anterior que se une a PD-1 comprende

a) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 300, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 301;

b) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 310, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 311;

c) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 320, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 321;

d) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 330, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 331;

e) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 340, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 341;

f) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 350, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 351;

g) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 360, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 361; o

h) una cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 370, y una cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 371.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica óptima se determina dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente. En determinadas realizaciones, tales composiciones pueden influenciar el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de depuración *in vivo* del constructo de anticuerpo de la invención. En ciertas realizaciones, el vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo portador adecuado puede ser agua para inyección o solución salina fisiológica, posiblemente complementada con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden el constructo de anticuerpo de la invención puede prepararse para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación óptimos (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, en determinadas realizaciones, el constructo de anticuerpo de la invención puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas a ser utilizadas en esta invención pueden proporcionarse en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable que comprende la construcción de anticuerpos de la invención deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que el constructo de anticuerpo de la invención se formula como una solución isotónica estéril preservada en forma adecuada. En determinadas realizaciones, la preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente que puede proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse por medio de una inyección de depósito, o aque puede promover la duración sostenida en la circulación. En determinadas realizaciones, pueden utilizarse dispositivos implantables para la administración de fármacos para introducir el constructo de anticuerpo deseado.

Las composiciones farmacéuticas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo las formulaciones que implican el constructo de anticuerpo de la invención en formulaciones de administración sostenida o controlada. Las técnicas para formular una variedad de medios de administración sostenida o controlada las conocen los expertos en la técnica. El constructo de anticuerpo puede atraparse también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, en sistemas de administración de fármacos coloidales, o en macroemulsiones.

Tales técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas usadas para administración *in vivo* se proporcionan normalmente en forma de preparaciones estériles. La esterilización puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando se liofiliza la composición, puede llevarse a cabo la esterilización usando este método, ya sea antes o después de la liofilización y la reconstitución. Las composiciones para administración parenteral pueden almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Otro aspecto de la invención incluye formulaciones autotamponantes que comprenden el constructo de anticuerpo de la invención, que pueden usarse como composiciones farmacéuticas, tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006/138181. Una variedad de publicaciones están disponibles sobre la estabilización de proteínas y materiales de formulación y métodos útiles en este sentido, tales como Arawaka T. et al., Pharm Res. 1991 Mar;8(3):285-91; Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" en: Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph y Jones, Pharm Biotechnol. 2002;13:159-75, véanse particularmente las partes pertinentes a excipientes y procesos para autotamponar formulaciones de proteínas, especialmente productos farmacéuticos de proteínas y procesos para usos médicos humanos y/o veterinarios.

Pueden usarse sales según determinadas realizaciones de la invención, por ejemplo con el fin de ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una composición o formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o estabilidad física de un constructo de anticuerpo u otro componente de una composición según la invención. Los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas al unirse a los residuos cargados en la superficie de la proteína y al proteger los grupos cargados y polares en la proteína y reducir la fuerza de sus interacciones electrostáticas, atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína al unirse, en particular, a los enlaces peptídicos desnaturalizados (--CONH) de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, por lo tanto, prevenir o reducir la agregación de proteínas y la insolubilidad.

Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado una serie de clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que se pueden usar en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo

con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y no iónicos polares por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Se hace referencia a los solutos estabilizantes como "cosmotrópicos". Se hace referencia a los solutos desestabilizantes como "caotrópicos". Se usan comúnmente cosmótopos a altas concentraciones para precipitar proteínas de una disolución ("eliminación de sales"). Se usan comúnmente caótopos para desnaturalizar y/o para solubilizar proteínas ("incorporación de sales"). La eficacia relativa de los iones para "eliminar sales" o "incorporar sales" define su posición en la serie Hofmeister.

Pueden usarse aminoácidos libres en formulaciones o composiciones que comprenden el constructo de anticuerpo de la invención según diversas realizaciones de la invención como agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes, así como para otros usos convencionales. Pueden usarse determinados aminoácidos para estabilizar proteínas en una formulación, otros son útiles durante la liofilización para garantizar una estructura de torta y propiedades correctas del principio activo. Algunos aminoácidos pueden ser útiles para inhibir la agregación de proteínas en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas, y otros son útiles como antioxidantes.

Los polioles son cosmotrópicos y son útiles como agentes estabilizantes en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas para proteger proteínas de procesos de degradación físicos y químicos. Los polioles son también útiles para ajustar la tonicidad de formulaciones y para proteger frente a tensiones de congelación-descongelación durante el transporte o la preparación de volúmenes durante el proceso de fabricación. Los polioles pueden servir también como crioprotectores en el contexto la presente invención.

Determinadas realizaciones de la formulación o composición que comprende el constructo de anticuerpo de la invención pueden comprender tensioactivos. Las proteínas pueden ser susceptibles a la adsorción sobre superficies y a la desnaturalización y agregación resultante en superficies de contacto aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estas interacciones perjudiciales generalmente se escalan inversamente con la concentración de proteínas y, típicamente, se ven agravadas por la agitación física, como la generada durante el envío y manipulación de un producto. Los tensioactivos se utilizan habitualmente para prevenir, minimizar o reducir la adsorción de la superficie. Los tensioactivos también se usan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos en este sentido es específico de proteína, puesto que un tensioactivo específico normalmente estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

Determinadas realizaciones de la formulación o composición que comprende el constructo de anticuerpo de la invención pueden comprender uno o más antioxidantes. Puede prevenirse hasta cierto punto la oxidación perjudicial de las proteínas en las formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles adecuados de oxígeno y temperatura ambiental y evitando

la exposición a la luz. También pueden usarse excipientes antioxidantes para prevenir la degradación oxidativa de proteínas. Se prevé que los antioxidantes para su uso en formulaciones terapéuticas de proteínas según la presente invención puedan ser solubles en agua y mantengan y actividad a lo largo de toda la vida útil de almacenamiento del producto (la composición que comprende el constructo de anticuerpo). Los antioxidantes también pueden dañar proteínas y, por tanto, entre otras cosas, deben seleccionarse de un modo para eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que los antioxidantes dañen el constructo de anticuerpo u otras proteínas en la formulación.

Determinadas realizaciones de la formulación o composición que comprende el constructo de anticuerpo de la invención pueden comprender uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios por ejemplo cuando se desarrollan composiciones parenterales multidosis que implican más de una extracción desde el mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante la vida útil o el término de uso del producto farmacéutico. Si bien los conservantes tienen una larga historia de uso con parentales de molécula pequeña, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes tienen muy a menudo un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante en la limitación de su uso en formulaciones de proteínas multidosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando las formulaciones multidosis son posibles, tienen la ventaja adicional de permitir la comodidad del paciente y una mayor capacidad de comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona de crecimiento humano (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones de tipo lápiz de inyección de uso múltiple más convenientes. Varios aspectos deben ser considerados durante la formulación y desarrollo de formas de dosificación conservadas. La concentración de conservante eficaz en el fármaco debe ser optimizada. Esto requiere probar un conservante dado en la forma farmacéutica con intervalos de concentraciones que proporcionan eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína.

Como podría esperarse, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que el formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contenga un diluyente en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con el constructo de anticuerpo, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante debe mantenerse a lo largo de toda la vida útil de almacenamiento del producto. Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente. Una

vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o en forma de un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

La actividad biológica de la composición farmacéutica definida en el presente documento puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos de citotoxicidad, tal como se describe en los siguientes ejemplos, en el documento WO 99/54440 o en Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficacia" o "eficacia *in vivo*" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la respuesta al tratamiento por la composición o formulación farmacéutica de la invención, utilizando, por ejemplo, criterios de respuesta del INC estandarizados. El éxito o la eficacia *in vivo* del tratamiento utilizando una composición farmacéutica de la invención se refiere a la efectividad de la composición para su fin pretendido, es decir, la capacidad que tiene la composición en provocar su efecto deseado, es decir, la eliminación de células patológicas, por ejemplo, células tumorales. La eficacia *in vivo* puede monitorizarse mediante métodos convencionales establecidos para las respectivas entidades de la enfermedad que incluyen, pero no se limitan a, recuentos de leucocitos, diferenciales de leucocitos, clasificación celular activada por fluorescencia, aspiración de médula ósea. Además, pueden utilizarse diversos parámetros de química clínica específicos de la enfermedad y otros métodos estándar establecidos. Además, pueden usarse tomografía ayudada por ordenador, rayos X, tomografía de resonancia magnética nuclear, exploración por tomografía de emisión de positrones, biopsias/histologías de ganglios linfáticos y otros métodos convencionales establecidos.

Otro desafío importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica de la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Con este objetivo, se puede establecer un perfil farmacocinético del fármaco candidato, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan la capacidad de un fármaco particular en tratar un trastorno dado. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que impactan en la capacidad de un fármaco de tratar una determinada entidad de enfermedad incluyen, de modo no taxativo, la semivida, volumen de distribución, metabolismo de primer paso hepático y el grado de unión del suero sanguíneo. La eficacia de un fármaco dado puede estar influenciada por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente.

"Semivida" es el tiempo requerido para que una cantidad se reduzca hasta la mitad de su valor inicial. Las ciencias médicas se refieren a la semivida de sustancias o fármacos en el cuerpo humano. En un contexto médico, la semivida puede referirse al tiempo que tarda una sustancia / fármaco en perder la mitad de su actividad, por ejemplo actividad farmacológica, fisiológica o radiológica. La semivida también puede describir el tiempo que se tarda en que la

concentración de un fármaco o sustancia (por ejemplo, un constructo de anticuerpo de la invención) en plasma / suero sanguíneo alcance la mitad de su valor de estado estacionario ("semivida sérica"). Normalmente, la eliminación o retirada de una sustancia / fármaco administrado se refiere a la limpieza del cuerpo a través de procesos biológicos tales como metabolismo, excreción, que implican también la función de riñones e hígado. El "metabolismo de primer paso" es un fenómeno del metabolismo de fármacos mediante el cual la concentración de un fármaco se reduce antes de que alcance la circulación. Es la fracción de fármaco perdida durante el proceso de absorción. Por consiguiente, por "metabolismo de primer paso hepático" quiere decirse la propensión de un fármaco a metabolizarse tras el primer contacto con el hígado, es decir, durante su primer paso a través del hígado. "Volumen de distribución" (V_D) significa el grado en el que un fármaco se distribuye en el tejido corporal en vez del plasma sanguíneo, indicando un V_D superior una mayor cantidad de distribución tisular. La retención de un fármaco puede producirse a lo largo de todos los diversos compartimentos del cuerpo, tales como espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. "Grado de unión a suero sanguíneo" significa la propensión de un fármaco a interaccionar con y unirse a proteínas séricas sanguíneas, tales como albúmina, conduciendo a una reducción o pérdida de actividad biológica del fármaco.

Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, lapso de tiempo (T lag), $T_{m\acute{a}x}$, tasas de absorción y/o $C_{m\acute{a}x}$ para una cantidad dada de fármaco administrado. "Biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una dosis administrada de un fármaco / sustancia que alcanza la circulación sistémica (el compartimento sanguíneo). Cuando se administra una medicación por vía intravenosa, su biodisponibilidad se considera que es del 100%. Sin embargo, cuando se administra una medicación por otras vías (tal como por vía oral), su biodisponibilidad generalmente disminuye. "Lapso de tiempo" se refiere al tiempo de demora entre la administración del fármaco y su detección y medición en sangre o plasma. $C_{m\acute{a}x}$ es la concentración en plasma máxima que logra un fármaco tras su administración (y antes de la administración de una segunda dosis). $T_{m\acute{a}x}$ es el tiempo al que se alcanza $C_{m\acute{a}x}$. El tiempo para alcanzar una concentración de fármaco en sangre o tejido que se requiere para su efecto biológico, está influenciado por todos los parámetros. Los parámetros farmacocinéticos de constructos de anticuerpos que presentan especificidad de especie cruzada pueden determinarse en pruebas preclínicas en animales en primates distintos de chimpancés tal como se explicó de manera resumida anteriormente y se expone por ejemplo en Schlereth *et al.* (citado anteriormente).

Una realización proporciona el constructo de anticuerpo de la invención (o el constructo de anticuerpo producido según el proceso de la invención) para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad, preferiblemente una neoplasia. Otra realización proporciona el uso del constructo de anticuerpo de la invención (o del

constructo de anticuerpo producido según el procedimiento de la invención) en la fabricación de un medicamento para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad, preferiblemente una neoplasia. También se prevé proporcionar un método para la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad, preferiblemente una neoplasia, que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita el constructo de anticuerpo de la presente invención (o el constructo de anticuerpo producido según el procedimiento de la presente invención). Los términos "sujeto que lo necesita", "paciente" o aquellos "que necesitan tratamiento" incluyen los que ya tienen la enfermedad, así como aquellos en los que va a prevenirse la enfermedad. Los términos también incluyen sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento o bien profiláctico o bien terapéutico.

Los constructos de anticuerpos de la invención y las formulaciones / composiciones farmacéuticas descritas en la presente son útiles en el tratamiento, la mejora y/o la prevención del estado médico tal como se describe en la presente en un paciente que lo necesita. El término "tratamiento" se refiere a tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de los constructos de anticuerpos / composición farmacéutica al cuerpo, o a un tejido aislado, o a una célula de un paciente o un sujeto que lo necesita que tiene una enfermedad/trastorno tal como se describe en la presente, un síntoma de tal enfermedad/trastorno o una predisposición hacia tal enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, potenciar o afectar a la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad. El término "mejora" tal como se usa en la presente se refiere a cualquier mejora del estado patológico de un paciente, mediante la administración de un constructo de anticuerpo según la invención a tal paciente o sujeto que lo necesita. Una mejora de este tipo puede observarse como una ralentización o detención de la progresión de la enfermedad del paciente, y/o como una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia o duración de los periodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención de la alteración o incapacidad debida a la enfermedad. El término "prevención" tal como se usa en la presente significa la evitación de la aparición o de la reaparición de una enfermedad tal como se especifica en la presente, mediante la administración de un constructo de anticuerpo según la invención a un sujeto que lo necesita.

El término "enfermedad" se refiere a cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento el constructo de anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en la presente. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellos trastornos patológicos que predisponen al mamífero a la enfermedad en cuestión. La enfermedad es preferiblemente una neoplasia, cáncer o tumor. La enfermedad, neoplasia, cáncer o tumor es preferiblemente positivo para CLDN18.2, es decir se caracteriza por la expresión o sobreexpresión de CLDN18.2.

Una "neoplasia" es un crecimiento anormal de tejido, generalmente, aunque no siempre, forma una masa. Cuando también se forma una masa, se denomina comúnmente "tumor". En tumores cerebrales, la división no controlada de células significa que la masa de una neoplasia aumenta de tamaño, y en un espacio confinado tal como la cavidad intracraneal esto se convierte rápidamente en un problema debido a que la masa invade el espacio del cerebro empujándolo a un lado, conduciendo a compresión del tejido cerebral y aumento de la presión intracraneal y destrucción del parenquima cerebral. Las neoplasias o tumores pueden ser benignos, potencialmente malignos (precancerosos) o malignos (cancerosos). Las neoplasias / tumores malignos se denominan comúnmente cáncer. Por lo general, invaden y destruyen el tejido circundante y pueden formar metástasis, es decir, se diseminan a otras partes, tejidos u órganos del cuerpo. Un "tumor primario" es un tumor que crece en el sitio anatómico en donde comenzó la progresión tumoral y avanzó para producir una masa cancerosa. Por ejemplo, un tumor cerebral se produce cuando se forman células anómalas dentro del cerebro. La mayoría de los cánceres se desarrollan en su sitio primario pero luego continúan metastatizándose o diseminándose a otras partes (por ejemplo tejidos y órganos) del cuerpo. Estos tumores son "tumores secundarios". La mayoría de los cánceres siguen denominándose según su sitio primario, incluso tras haberse diseminado a otras partes del cuerpo.

Los linfomas y las leucemias son neoplasias linfoides. A los efectos de la presente invención, también están comprendidos por los términos "tumor" o "cáncer". Para los fines de la presente invención, los términos "neoplasia", "tumor" y "cáncer" pueden usarse de manera intercambiable, y comprenden tanto tumores / cánceres primarios como tumores / cánceres secundarios (o "metástasis"), así como neoplasias que forman masas (tumores) y neoplasias linfoides (tales como linfomas y leucemias), y también MRD.

El término "enfermedad residual mínima" (MRD) se refiere a la evidencia de la presencia de pequeños números de células cancerosas residuales que permanecen en el paciente tras el tratamiento del cáncer, por ejemplo cuando el paciente está en remisión (sin síntomas ni signos de enfermedad). Un número muy pequeño de células cancerosas restantes no pueden detectarse por los medios de rutina debido a que las pruebas convencionales usadas para evaluar o detectar el cáncer no son lo suficientemente sensibles como para detectar MRD. Hoy en día, están disponibles pruebas de biología molecular muy sensibles para detectar MRD, tales como citometría de flujo, PCR y secuenciación de última generación. Estas pruebas pueden medir niveles mínimos de células cancerosas en muestras de tejido, algunas veces tan bajos como una célula cancerosa en un millón de células normales. En el contexto de la presente invención, los términos "prevención", "tratamiento" o "mejora" de un cáncer se prevé que también abarquen "prevención, tratamiento o mejora de MRD", ya se detecte la MRD o no.

En una realización de la invención, la neoplasia, cáncer o tumor se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, (o que consiste en) cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario y cáncer de pulmón. Según una realización de la invención, el cáncer gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico o de estómago, cáncer esofágico, cáncer gastroesofágico, cáncer pancreático y cáncer colorrectal. Según otra realización de la invención, el cáncer de ovario es cáncer de ovario mucinoso. Según una realización adicional de la invención, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.

El constructo de anticuerpo de la invención se diseñará generalmente para vías y métodos específicos de administración, para dosificaciones y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Los materiales de la composición están formulados preferentemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Las formulaciones y las composiciones por lo tanto se pueden diseñar de acuerdo con la invención para la administración por cualquier vía de administración adecuada. En el contexto de la presente invención, las vías de administración incluyen, pero no se limitan a vías tópicas, vías entéricas y vías parenterales.

Si la composición farmacéutica ha sido liofilizada, el material liofilizado se reconstituye primero en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado puede reconstituirse en, por ejemplo, agua bacteriostática para inyección (BWHI), suero fisiológico, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o la misma formulación donde ha estado la proteína antes de la liofilización. La composición farmacéuticas y el constructo de anticuerpo de esta invención son particularmente útiles para administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, por ejemplo mediante inyección o infusión. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Los ejemplos de dispositivos médicos para administrar las composiciones farmacéuticas se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447,233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851 y 5,399,163.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada que puede determinarse por ejemplo en estudios de escalada de la dosis. Tal como se expuso anteriormente, el constructo de anticuerpo de la invención que presenta especificidad de especie cruzada tal como se describe en la presente puede usarse también ventajosamente en pruebas preclínicas en primates distintos de chimpancés. El régimen de dosificación lo determinará el médico encargado y los factores clínicos. Tal como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluida la talla del paciente, el área de superficie del cuerpo, la edad, el compuesto

particular a administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente.

Una "dosis eficaz" es una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente un efecto deseado. Una "dosis terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones, signos y síntomas en un paciente que padece la enfermedad. Las cantidades o dosis eficaces para este uso dependerán de la enfermedad que se vaya a tratar (la indicación), el constructo de anticuerpo administrado, el contexto terapéutico y los objetivos, la gravedad de la enfermedad, la terapia anterior, los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al agente terapéutico, la vía de administración, el tamaño (peso corporal, superficie corporal) y/o el estado (la edad y la salud general) del paciente, y el estado general del propio sistema inmunitario del paciente. La dosis apropiada puede ajustarse según el juicio del médico encargado, con el fin de obtener el efecto terapéutico óptimo.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un constructo de anticuerpo de la invención preferentemente produce una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia o la duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la dolencia. En el tratamiento de tumores que expresan CLDN18.2, una cantidad terapéuticamente eficaz del constructo de anticuerpo de la invención inhibe preferiblemente el crecimiento de células tumorales en al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 80% o al menos aproximadamente el 90% en relación con pacientes sin tratar. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse también en un modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos.

En una realización adicional, la invención proporciona un kit que comprende un constructo de anticuerpo de la invención, un constructo de anticuerpo producido según el procedimiento de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped de la invención. En el contexto de la presente invención, el término "kit" significa dos o más componentes –uno de los cuales corresponde al constructo anticuerpo, la composición farmacéutica, el polinucleótido, el vector o la célula huésped de la invención– empaquetados juntos en un contenedor, recipiente o similar. Por lo tanto, un kit se puede describir como un conjunto de productos y/o utensilios que son suficientes para lograr un objetivo determinado, que se puede comercializar como una unidad simple.

Se prevé que un componente adicional del kit de la invención sea un agente, preferiblemente un anticuerpo o constructo de anticuerpo, que se une a una proteína de la ruta de punto de control inmunitario (tal como PD-1 o CTLA-4) o a un receptor de punto de control

inmunitario coestimulador (tal como 4-1BB). Estos agentes se describen en más detalle en la presente anteriormente. Según una realización, el kit comprende un constructo de anticuerpo de la invención y un anticuerpo o constructo de anticuerpo que se une a PD-1. Se describen en detalle por ejemplo proteínas de anti-PD-1 útiles para este propósito en el documento PCT/US2019/013205. En una determinada realización, el kit permite la administración simultánea y/o secuencial de los componentes.

El kit puede comprender uno o más recipientes (como viales, ampollas, contenedores, jeringas, botellas, bolsas) de cualquier forma, tamaño y material apropiado (preferentemente impermeable, p. ej. plástico o vidrio) que contenga el constructo de anticuerpo o la composición farmacéutica de la presente invención en una dosis apropiada para la administración (véase arriba). El kit además puede contener instrucciones para el uso (p. ej., en forma de un folleto o un manual de instrucciones), medios para administrar el constructo de anticuerpo o la composición farmacéutica de la presente invención tales como una jeringa, bomba, infusor o similar, medios para reconstituir el constructo de anticuerpo de la invención y/o medios para diluir el constructo de anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona kits para una unidad de administración de dosis única. El kit de la invención también puede contener un primer recipiente que comprende un constructo de anticuerpo o composición farmacéutica seca/liofilizada y un segundo recipiente que comprende una formulación acuosa. En determinadas realizaciones de esta invención, se proporcionan kits que contienen jeringas precargadas de una sola cámara o de múltiples cámaras.

La presente invención se refiere a los siguientes puntos:

Punto 1. Un constructo de anticuerpo que comprende un primer dominio que se une a CLDN18.2 (preferiblemente que tiene SEQ ID NO: 1) en la superficie de una célula diana y un segundo dominio que se une a CD3 en la superficie de una célula T.

Punto 2. Un constructo de anticuerpo según el punto 1, en el que el primer dominio se une al primer bucle extracelular (bucle 1) de CLDN18.2, teniendo el bucle preferiblemente SEQ ID NO: 2.

Punto 3. Un constructo de anticuerpo según el punto 1 o 2 que comprende

- un primer dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana, y
- un segundo dominio que se une a CD3 humana en la superficie de una célula T, en el que

el primer dominio se une al mismo epítipo de CLDN18.2 que un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140.

Punto 4. Un constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el constructo de anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo o constructo de anticuerpo que comprende un dominio que se une a CLDN18.2 en la superficie de una célula diana y que comprende:

a) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126;

b) una región VH que comprende CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y una región VL que comprende CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138;

c) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 127, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 128; o

d) una región VH tal como se representa en SEQ ID NO: 139, y una región VL tal como se representa en SEQ ID NO: 140.

Punto 5. Un constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio del constructo de anticuerpo se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 22, y opcionalmente también se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal

como se representa en SEQ ID NO: 24, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 23;

5 Punto 6. Un constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio del constructo de anticuerpo se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 14 y/o a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15, y opcionalmente también se une a uno o más mutantes de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene una
10 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las representadas en SEQ ID NO: 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20 y 21, pero no se une a un mutante de CLDN18.2 en la superficie de una célula diana que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 18;

15 Punto 7. Un constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio del constructo de anticuerpo se une a CLDN18.2 humana en la superficie de una célula diana, en el que Glu (E) en la posición 56 de CLDN18.2 humana es esencial para la unión del primer dominio, y Ala (A) en la posición 42 y/o Asn (N) en la posición 45 de CLDN18.2 humana es/son esenciales para la unión del primer dominio; y/o

20 Punto 8. Un constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio del constructo de anticuerpo se une a un epítipo de CLDN18.2 que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 266, pero que no comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 265, y opcionalmente también que no comprende la secuencia de aminoácidos
25 tal como se representa en SEQ ID NO: 267.

 Punto 9. El constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el segundo dominio se une a CD3 épsilon humana y a CD3 épsilon de *Callithrix jacchus* o *Saimiri sciureus*.

30 Punto 10. El constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que

- a) el constructo de anticuerpo, el primer dominio y/o el segundo dominio son humanos o humanizados,
- b) el constructo de anticuerpo es un constructo de anticuerpo de cadena sencilla,
- c) el primer dominio está en el formato de un scFv,
- 35 d) el segundo dominio está en el formato de un scFv,
- e) el primero y el segundo dominio se conectan por medio de un ligador, preferiblemente un ligador peptídico, más preferiblemente un ligador de glicina/serina, y/o

- f) el constructo de anticuerpo comprende un dominio que proporciona una semivida sérica prolongada, tal como un dominio basado en Fc.

Punto 11. El constructo de anticuerpo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio no se une o no se une significativamente a CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 y/o CLDN9.

Punto 12 El constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que

a) la afinidad del primer dominio por CLDN18.2 (por ejemplo CLDN18.2 hu) es ≤ 100 nM, ≤ 90 nM, ≤ 80 nM, ≤ 70 nM, ≤ 60 nM, ≤ 50 nM, ≤ 40 nM, ≤ 30 nM o ≤ 20 nM, tal como se mide preferiblemente en un ensayo basado en células, tal como un ensayo de Scatchard;

b) la afinidad del segundo dominio por CD3 (por ejemplo CD3 hu, por ejemplo CD3 épsilon hu) es ≤ 100 nM, ≤ 90 nM, ≤ 80 nM, ≤ 70 nM, ≤ 60 nM, ≤ 50 nM, ≤ 40 nM, ≤ 30 nM, ≤ 20 nM o ≤ 10 nM, tal como se mide preferiblemente en un ensayo de resonancia de plasmón superficial, tal como un ensayo de Biacore; y/o

c) el valor de CE_{50} del constructo de anticuerpo es ≤ 500 pM, ≤ 400 pM, ≤ 300 pM, ≤ 280 pM, ≤ 260 pM, ≤ 250 pM, ≤ 240 pM, ≤ 220 pM, ≤ 200 pM, ≤ 180 pM, ≤ 160 pM, ≤ 150 pM, ≤ 140 pM, ≤ 120 pM, ≤ 100 pM, ≤ 90 pM, ≤ 80 pM, ≤ 70 pM, ≤ 60 pM, ≤ 50 pM, ≤ 40 pM, ≤ 30 pM, ≤ 20 pM, ≤ 15 pM, ≤ 10 pM o ≤ 5 pM, tal como se mide preferiblemente en un ensayo de citotoxicidad con células diana positivas para CLDN18.2 (tales como células CHO transfectadas con SNU-601, SNU-620 o CLDN18.2) y células T positivas para CD8 enriquecidas estimuladas (humanas) o células mononucleares de sangre periférica no estimuladas (humanas) como células efectoras.

Punto 13. El constructo de anticuerpo según cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio comprende una región VH que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una región VL que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 seleccionadas del grupo que consiste en:

a) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 121, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 122, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 123, CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 124, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 125 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 126; y

b) CDR-H1 tal como se representa en SEQ ID NO: 133, CDR-H2 tal como se representa en SEQ ID NO: 134, y CDR-H3 tal como se representa en SEQ ID NO: 135, y CDR-L1 tal como se representa en SEQ ID NO: 136, CDR-L2 tal como se representa en SEQ ID NO: 137 y CDR-L3 tal como se representa en SEQ ID NO: 138.

Punto 14. El constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el primer dominio comprende una región VH que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 127 o SEQ ID NO: 139.

Punto 15. El constructo de anticuerpo según uno de los puntos anteriores, en el que el primer dominio comprende una región VL que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 128 o SEQ ID NO: 140.

5 Punto 16. El constructo de anticuerpo según uno de los puntos anteriores, en el que el primer dominio comprende una región VH y una región VL que tienen una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 127+128 o SEQ ID NO: 139+140.

Punto 17. El constructo de anticuerpo según uno de los puntos anteriores, en el que el primer dominio comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se representa en SEQ ID NO: 129 o SEQ ID NO: 141.

10 Punto 18. El constructo de anticuerpo según uno de los puntos anteriores, que comprende o que consiste en un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de las representadas en SEQ ID NO: 131, la SEQ ID NO: 132, la SEQ ID NO: 143, y SEQ ID NO: 144.

15 Punto 19. Un polinucleótido que codifica para un constructo de anticuerpo tal como se define en uno cualquiera de los puntos anteriores.

Punto 20. Un vector que comprende un polinucleótido tal como se define en el punto 19.

Punto 21. Una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido tal como se define en el punto 19 o con el vector tal como se define en el punto 20.

20 Punto 22. Un procedimiento para producir un constructo de anticuerpo tal como se define en uno cualquiera de los puntos 1 a 18, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped tal como se define en el punto 21 en condiciones que permiten la expresión de dicho constructo de anticuerpo y recuperar el constructo de anticuerpo producido a partir del cultivo.

25 Punto 23. Una composición farmacéutica que comprende un constructo de anticuerpo tal como se define en uno cualquiera de los puntos 1 a 18, o producido según el procedimiento del punto 22.

30 Punto 24. El constructo de anticuerpo según uno cualquiera de los puntos 1 a 18, o producido según el procedimiento del punto 22, para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad, preferiblemente una neoplasia, más preferiblemente una neoplasia positiva para CLDN18.2.

Punto 25. El constructo de anticuerpo según el punto 24, en el que la enfermedad o neoplasia se selecciona del grupo que consiste en cáncer gastrointestinal, cáncer de ovario y cáncer de pulmón.

35 Punto 26. El constructo de anticuerpo según el punto 25, en el que el cáncer gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer gastroesofágico, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

Punto 27. Un kit que comprende un constructo de anticuerpo tal como se define en uno cualquiera de los puntos 1 a 18, un constructo de anticuerpo producido según el procedimiento del punto 22, un polinucleótido tal como se define en el punto 19, un vector tal como se define en el punto 20 y/o una célula huésped tal como se define en el punto 21.

Punto 28. La composición farmacéutica del punto 23 o el kit del punto 27, que comprende además un agente, preferiblemente un anticuerpo o constructo de anticuerpo, que se une a una proteína de la ruta de punto de control inmunitario (tal como PD-1 o CTLA-4) o a un receptor de punto de control inmunitario coestimulador (tal como 4-1BB).

Punto 29. La composición farmacéutica del punto 23 o 28, o el kit del punto 27 o 28, para uso terapéutico, preferiblemente para su uso en la prevención, el tratamiento o la mejora de una enfermedad, preferiblemente una neoplasia, más preferiblemente una neoplasia positiva para CLDN18.2.

LAS FIGURAS MUESTRAN:

Figura 1

Alineación de la secuencia de aminoácidos de CLDN18.1 y CLDN18.2 humanas. Los dominios extracelulares primero y segundo están resaltados (= bucles extracelulares), así como las posiciones de aminoácido que difieren entre CLDN18.1 y CLDN18.2. Dentro del bucle extracelular 1, CLDN18.2 y CLDN18.1 difieren en ocho posiciones. Véase también el ejemplo 1.

Figura 2

La figura representa los constructos de CLDN18.2 (quimeras / mutaciones puntuales) que se generaron para el análisis de mapeo de epítomos del ejemplo 2. También muestra la alineación de secuencias entre el bucle 1 de CLDN18.1 humana y el bucle 1 de CLDN18.2 humana y resalta las otras posiciones P1-P8 en las que estas dos moléculas difieren. Véase también el ejemplo 1.

Figura 3

Resultados del análisis de mapeo de epítomos, véase el ejemplo 2. La figura muestra los análisis de FACS de células CHO no transfectadas, así como células CHO transfectadas con CLDN18.1 hu, CLDN18.2 hu, CLDN6 hu y CLDN9 hu (lado a mano izquierda). En el lado a mano derecha, la figura muestra análisis de FACS de células CHO transfectadas con tres constructos de CLDN18.2 hu quiméricos: La secuencia de aminoácidos de todo el bucle 2 (ECL2, E2) se intercambió por una secuencia que se origina a partir de CLDN9 humana, y las regiones E2A y E2B se intercambiaron por una secuencia homóloga de CLDN6 humana. Todos los anticuerpos / constructos de anticuerpos se sometieron a prueba a una concentración de 5 µg/ml.

Figura 4

Resultados del análisis de mapeo de epítomos, véase el ejemplo 2. La figura muestra los análisis de FACS de células CHO no transfectadas, así como de células CHO transfectadas con CLDN18.1 hu, CLDN18.2 hu, CLDN6 hu y CLDN9 hu. Además, la figura muestra los análisis de FACS de células CHO transfectadas con once constructos de CLDN18.2 hu diferentes que tienen una, dos o tres mutaciones en las posiciones indicadas P1-P8 (para detalles adicionales, véase también el ejemplo 1), así como de células CHO transfectadas con cuatro constructos de CLDN18.2 hu quiméricos diferentes: La secuencia de aminoácidos de todo el bucle 2 (ECL2, E2) se intercambió por una secuencia que se origina a partir de CLDN9 humana, y las regiones E1B, E1D y E1C se intercambiaron por una secuencia homóloga de CLDN6 humana (para detalles adicionales, véase también el ejemplo 1). Todos los anticuerpos monoespecíficos se sometieron a prueba a una concentración de 5 µg/ml, mientras que los constructos de anticuerpos biespecíficos frente a CD3xCLDN18.2 se sometieron a prueba a una concentración de 20 µg/ml.

Fila 1: α-CLDN-18.1 hu interna

Fila 2: α-CLDN-18.2 hu interna

Fila 3: α-CLDN-6 hu (R&D; MAB3656)

Fila 4: α-CLDN-9 hu (ABIN1720917)

Fila 5: CL-1xI2C-scFc

Fila 6: CL-2xI2C-scFc

Fila 7: CL-4xI2C-scFc

Fila 8: CL-3xI2C-scFc

Figura 5

Resultados del ensayo de FACS descrito en el ejemplo 5.

Figura 6

Resultados del ensayo de FACS descrito en el ejemplo 6.

Figura 7

Resultados de los ensayos de citotoxicidad basados en FACS descritos en el ejemplo 7.4. En las seis líneas celulares sometidas a prueba (cinco líneas celulares expresas naturales y células CHO transfectadas con CLDN18.2 hu), los constructos de anticuerpos de la invención (CL-1 y CL-2) mostraron valores de CE₅₀ significativamente superiores en comparación con los constructos de control que se unen a un epítipo de CLDN18.2 diferente (CL-3 y CL-4).

Figura 8

Actividad antitumoral de un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 (volumen tumoral medio con error estándar de la media (EEM)). Véase el ejemplo 13.

Figura 9

Actividad de formación antitumoral de un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 (volumen tumoral medio con error estándar de la media (EEM)). Véase el ejemplo 14.

5 Tal como se usan en la presente, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de dichos reactivos y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían ser modificados o sustituidos por los métodos descritos en el presente documento.

10 A menos que se indique lo contrario, se entenderá que la expresión "al menos" antes de una serie de elementos hace referencia a cada elemento de la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar sin utilizar nada más que experimentación rutinaria, muchas equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes sean abarcados por la presente invención.

Cuando se utiliza en el presente documento, "y/o" incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término".

20 Tal como se usan en la presente, las expresiones "alrededor de" o "aproximadamente" significan dentro de $\pm 20\%$, preferentemente dentro de $\pm 15\%$, más preferentemente dentro de $\pm 10\%$, y con mayor preferencia dentro de $\pm 5\%$ de un valor o un intervalo dados. También se incluye el valor concreto, por ejemplo, "aproximadamente 50" incluye el valor "50".

25 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto lo exija de otro modo, el término "comprende", y las variaciones, tales como, "que comprende", debe entenderse como que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se utiliza en el presente documento, "que comprende" se puede sustituir con las expresiones "que contiene" o "que incluye" cuando se usa en el presente documento con la expresión "que tiene".

30 Cuando se utiliza en el presente documento, "que consiste en" excluye cualquier elemento, paso o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento "que consiste esencialmente de" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación.

35 En cada caso en el presente documento, se puede reemplazar cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" por cualquiera de las otras dos expresiones.

Debe entenderse que la descripción anterior y los ejemplos a continuación proporcionan disposiciones a modo de ejemplo, pero la presente invención no se limita a las metodologías, técnicas, protocolos, material, reactivos, sustancias, etc. particulares, descritos en la presente y como tales pueden variar. La terminología utilizada en el presente documento

5 tiene el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se limita solamente mediante las reivindicaciones. Se proporcionan aspectos de la invención en las reivindicaciones independientes. Algunas características opcionales de la invención se proporcionan en las reivindicaciones dependientes.

Todas las publicaciones y patentes citadas en el texto de la presente memoria

10 descriptiva (lo que incluye todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sea anteriormente o en adelante, se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad. Ningún contenido de la presente debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a dicha descripción en virtud de la invención anterior. En la medida en que el material

15 incorporado mediante referencia se contradiga o no sea coherente con la presente memoria descriptiva, la memoria descriptiva suplantarán dicho material.

Se comprenderán mejor la presente invención y sus ventajas a partir de los siguientes ejemplos, que tienen fines únicamente ilustrativos. Los ejemplos no pretenden y no deben interpretarse como que limitan el alcance de la presente invención de ningún modo.

EJEMPLO 1

Generación de células CHO que expresan mutaciones de CLDN18.2

Para los propósitos de mapeo de epítomos, E1 (bucle extracelular 1; ECL1, SEQ ID NO: 2) de CLDN18.2 se dividió en cuatro subdominios (E1A, E1B, E1C y E1D), y E2 (bucle extracelular 2; ECL2, SEQ ID NO: 3) se dividió en dos subdominios (E2A y E2B). La secuencia

25 de aminoácidos de la respectiva región de epítomos (bucle / dominio o subdominio) de CLDN18.2 humana (E1, E1A, E1B, E1C, E1D, E2, E2A y E2B) se intercambió por una secuencia homóloga de CLDN6 humana, con dos excepciones (véanse las figuras 1 y 2): E2 se intercambió por una secuencia que se origina a partir de CLDN9 humana; y el constructo que tiene un E1C mutado (intercambio de CLDN18.2 E1C por la región de CLDN6 homóloga),

30 E2 de CLDN18.2 también se intercambió por una secuencia que se origina a partir de CLDN9 humana. Esto último sirvió como medio para detectar la expresión de la quimera CLDN18.2/CLDN6. La expresión de todos los constructos quiméricos en células CHO se verificó por medio de análisis de FACS (véase a continuación). Puesto que no había pruebas de expresión para los constructos quiméricos de E1 y E1A, estos constructos no se usaron

35 para el análisis de mapeo de epítomos. Se generaron por tanto los siguientes constructos y se usaron para mapeo de epítomos:

CLDN18.2-E1B (CLDN6) → SEQ ID NO: 22

CLDN18.2-E1C (CLDN6)-E2 (CLDN9) → SEQ ID NO: 23

CLDN18.2-E1D (CLDN6) → SEQ ID NO: 24

CLDN18.2-E2 (CLDN9) → SEQ ID NO: 25

CLDN18.2-E2A (CLDN6) → SEQ ID NO: 26

5 CLDN18.2-E2B (CLDN6) → SEQ ID NO: 27

Las secuencias de aminoácidos de CLDN18.2-ECL2 humana y CLDN18.1-ECL2 humana son idénticas, pero dentro del bucle extracelular 1, CLDN18.2 y CLDN18.1 difieren en ocho posiciones (29, 37, 42, 45, 47, 56, 65 y 69). Por tanto, se generaron mutantes de CLDN18.2 adicionales y se expresaron en células CHO, en las que estas ocho posiciones de CLDN18.2 "P1" a "P8" se intercambiaron por sus respectivos homólogos de CLDN18.1, o bien individualmente o bien en un grupo de dos o tres posiciones. Se generaron por tanto los siguientes constructos:

CLDN18.2-P1-CLDN18.1 (mutación Q29M) → SEQ ID NO: 11

CLDN18.2-P2-CLDN18.1 (mutación N37D) → SEQ ID NO: 12

15 CLDN18.2-P1/P2-CLDN18.1 (mutación Q29M / N37D) → SEQ ID NO: 13

CLDN18.2-P3-CLDN18.1 (mutación A42S) → SEQ ID NO: 14

CLDN18.2-P4-CLDN18.1 (mutación N45Q) → SEQ ID NO: 15

CLDN18.2-P5-CLDN18.1 (mutación Q47E) → SEQ ID NO: 16

CLDN18.2-P3/P4/P5-CLDN18.1 (mutación A42S / N45Q / Q47E) → SEQ ID NO: 17

20 CLDN18.2-P6-CLDN18.1 (mutación E56Q) → SEQ ID NO: 18

CLDN18.2-P7-CLDN18.1 (mutación G65P) → SEQ ID NO: 19

CLDN18.2-P8-CLDN18.1 (mutación L69I) → SEQ ID NO: 20

CLDN18.2-P7/P8-CLDN18.1 (mutación G65P / L69I) → SEQ ID NO: 21

25 Para la generación de células CHO que expresan los constructos anteriores, así como de células CHO que expresan hu-CLDN18.2, hu-CLDN18.1, hu-CLDN6 y hu-CLDN9 (SEQ ID NO: 1, 4, 9 y 10) como controles, se clonaron las respectivas secuencias codificantes en un plásmido designado pEF-DHFR (pEF-DHFR se describe en Raum *et al.* Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Todos los procedimientos de clonación se llevaron a cabo según protocolos convencionales (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York (2001)).

30 Para cada constructo, se transfectó un plásmido correspondiente en células CHO deficientes en DHFR para la expresión eucariota, tal como describe Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566.

35 La expresión de los constructos anteriores en células CHO se verificó en un ensayo de FACS usando anticuerpos contra CLDN18.2 (anticuerpo monoclonal anti-CLDN18.2 hu interno), CLDN18.1 (anticuerpo monoclonal anti-CLDN18.1 hu interno), CLDN6 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-CLDN6 humana de R&D MAB3656) y CLDN9 (anticuerpo

monoclonal de rata anti-CLDN9 humana ABIN1720917), respectivamente, a una concentración de 5 µg/ml. Como control negativo, se incubaron las células con un anticuerpo de control de isotipo (BD 553454 / R&D MAB0041 / R&D MAB0061) en lugar del primer anticuerpo. Se detectó el anticuerpo monoclonal unido con un Fc-gamma-PE secundaria anti-IgG humana / anti-rata / anti-ratón (Jackson ImmunoResearch 115-116-071 / 112-116-071 / 109-116-098). Las muestras se midieron mediante citometría de flujo.

EJEMPLO 2

Mapeo de epítomos de constructos de anticuerpos anti-CLDN18.2

Se tiñeron células CHO transfectadas con los constructos descritos en el ejemplo 1 con constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 a una concentración de 20 µg/ml. Se detectaron los constructos de anticuerpos unidos con un Fc-gamma-PE anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch; 1:100). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS / FCS al 2%. Como control negativo, se incubaron las células con PBS / FCS al 2% seguido por Fc-gamma-PE anti-IgG humana. Las muestras se midieron mediante citometría de flujo.

Los resultados del análisis de mapeo de epítomos se muestran en las figuras 3 y 4. Cuando se observa una pérdida de la señal de FACS para células que expresan una determinada mutación o quimera de CLDN18.2, se supone que el respectivo constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 se une al epítipo (bucle / dominio / subdominio) o al aminoácido específico que se intercambiaba en esta molécula mutada o quimérica de CLDN18.2. En otras palabras, este aminoácido o región de epítipo se requiere para la unión del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 que se analizó. Además de los anticuerpos de control que se usaron para demostrar la expresión apropiada de la respectiva diana, los siguientes constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 se sometieron a prueba específicamente en el análisis de mapeo de epítomos:

CL-1 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 132)

CL-2 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 144)

CL-3 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 149)

CL-4 x I2C-scFc (SEQ ID NO: 154)

mientras que CL-1 x I2C-scFc y CL-2 x I2C-scFc son constructos de anticuerpos según la invención, CL-3 x I2C-scFc y CL-4 x I2C-scFc tienen regiones VH y VL anti-CLDN18.2 que se dan a conocer como SEQ ID NO: 8+15 y las SEQ ID NO: 6+11, respectivamente, del documento WO 2014/075788.

Tal como se muestra en la figura 4, el constructo de anticuerpo frente a CL-3 x I2C-scFc requiere claramente las posiciones P3 (A42), P4 (N45) y P6 (E56) para su unión específica a CLDN18.2. La posición P4 se ubica dentro del subdominio denominado E1B, y la posición P6 se ubica dentro del subdominio denominado E1C. En consecuencia y asimismo, un intercambio de estos subdominios con la secuencia homóloga de CLDN6 conduce a una

pérdida de la señal de FACS. La observación de que estas tres posiciones son relevantes para la unión de CL-3 x I2C-scFc a CLDN18.2 confirma los resultados previamente publicados. El constructo de anticuerpo denominado CL-4 x I2C-scFc tiene un patrón de unión muy similar (véase la figura 4).

5 En cambio, ambos constructos de anticuerpos CL-1 x I2C-scFc y CL-2 x I2C-scFc requieren claramente la posición P6 (E56) para su unión específica a CLDN18.2. Sin embargo, el intercambio de otras posiciones, en particular de P3 y P4, no parece tener ningún impacto sobre la unión de CL-1 x I2C-scFc o CL-2 x I2C-scFc a CLDN18.2. En línea con esta observación, el intercambio del subdominio E1C (en el que se ubica la posición P6) con la
10 secuencia homóloga de CLDN6, pero no el intercambio de E1B o E1D, conduce a una pérdida de la señal de FACS. El resultado de mapeo de epítomos representado en la figura 4 muestra por tanto que CL-1 x I2C-scFc y CL-2 x I2C-scFc se unen al mismo epítipo dentro de ECL1 de CLDN18.2, y este epítipo difiere de el de CL-3 x I2C-scFc y CL-4 x I2C-scFc.

EJEMPLO 3

15 Determinación basada en Biacore de la afinidad por CD3 y FcRn humanos y de cynomolgus

Se realizaron experimentos de análisis de Biacore usando proteínas de fusión de CD3-ECD humanas / de macaco recombinantes (ECD = dominio extracelular) con albúmina de pollo para determinar la unión a la diana de los constructos de anticuerpos de la invención.

20 En detalle, se inmovilizaron chips sensores CM5 (GE Healthcare) con aproximadamente 600-800 RU del respectivo antígeno recombinante usando tampón acetato pH 4.5 según el manual del fabricante. Se cargó el constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 en una serie de dilución de las siguientes concentraciones: 50 nM, 25 nM, 12.5 nM, 6.25 nM y 3.13 nM diluido en tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare). La
25 velocidad de flujo fue de 30 µl/min durante 3 min, luego se aplicó tampón de ejecución HBS-EP durante de 8 min a 20 min de nuevo a una velocidad de flujo de 30 µl/ml. Se realizó la regeneración del chip usando disolución de glicina 10 mM NaCl 10 mM pH 1.5. Se analizaron los conjuntos de datos usando el software BiaEval. En general, se realizaron dos experimentos independientes.

30 Los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 según la invención mostraron altas afinidades por CD3 humana en el intervalo nanomolar. La unión a CD3 de macaco se equilibró, mostrando también afinidades en intervalos similares. Los valores de afinidad así como la brecha de afinidad calculada se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: afinidades de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 por CD3
35 humana y de macaco tal como se determina mediante análisis de Biacore, así como las brechas de afinidad entre especies calculadas. Los constructos en las filas 3-5 se midieron en un ensayo diferente (separado) que los constructos en las filas 1 y 2.

	Construido de anticuerpo frente a CLDN18.2 x CD3	KD CD3 hu [nM]	KD CD3 de cyno [nM]	Brecha de afinidad KD mac/KD hu
1	CL-1 x I2C-scFc	23.5 ± 1.0	19.7 ± 1.1	0.84
2	CL-1 x I2C-6His	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.2	0.85
3	CL-2 x I2C-scFc	8.32 ± 0.64	4.67 ± 0.18	0.56
4	CL-3 x I2C-scFc	14.50 ± 0.07	7.91 ± 0.37	0.55
5	CL-4 x I2C-scFc	15.30 ± 2.55	9.19 ± 0.16	0.60

Asimismo, se confirmó una unión equilibrada a FcRn humano y de cyno por medio de ensayos de Biacore para los constructos denominados CL-1 x I2C-scFc, CL-2 x I2C-scFc, CL-3 x I2C-scFc y CL-4 x I2C-scFc.

EJEMPLO 4

Análisis basado en Scatchard de la afinidad por CLDN18.2 humana y de macaco en células positivas para el antígeno diana

Se determinaron las afinidades de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 por células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana o de macaco mediante análisis de Scatchard. Para esta análisis, se realizaron experimentos de unión de saturación usando un sistema de detección monovalente para determinar de manera precisa la unión monovalente de los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 a la respectiva línea celular.

Se incubaron 2×10^4 células de la línea celular CHO que expresa de manera recombinante CLDN18.2 humana cada una con 50 µl de una serie de dilución (doce diluciones a 1:2) del respectivo constructo de anticuerpo (hasta que se alcanzó la saturación) comenzando a 100-200 nM seguido por incubación de 16 h a 4°C con agitación y una etapa de lavado residual. Entonces, se incubaron las células durante otra hora con 30 µl de una disolución de fragmento Fab AffiniPure™ conjugado con Alexa Fluor™ 488 de cabra anti-IgG humana (H+L). Tras una etapa de lavado, se resuspendieron las células en 150 µl de tampón de FACS que contenía formaldehído al 3.5%, se incubaron durante 15 min adicionales, se centrifugaron, se resuspendieron en tampón de FACS y se analizaron por medio de software de FACS. Se generaron datos a partir de dos conjuntos independientes de experimentos, usando cada uno por triplicado. Se calculó la evaluación de unión específica de un sitio respectiva para extrapolar la unión máxima (Bmax). Se determinaron las concentraciones de los constructos de anticuerpos a la mitad de la unión máxima que refleja las respectivas KD. Se representaron gráficamente valores de mediciones por triplicado como curvas hiperbólicas y como curvas con forma de S para demostrar los intervalos apropiados de concentración desde la unión mínima a óptima.

Los valores representados en la tabla 3 se derivaron de dos experimentos independientes por constructo de anticuerpo. El análisis de Scatchard basado en células confirmó que los constructos de anticuerpos frente CLDN18.2xCD3 de la invención tienen una afinidad nanomolar por CLDN18.2 humana y, debido a la identidad de secuencia de los dominios extracelulares humanos y de macaco, presentan una brecha de afinidad entre especies de cyno/humana de 1.

Tabla 3: Afinidades (KD) de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 con respecto a CLDN18.2 tal como se determina en análisis de Scatchard basado en células. Se midieron constructos de anticuerpos en dos experimentos independientes, usando cada uno una serie de dilución. *CLDN18.2 humana y de cynomolgus comparten la secuencia de aminoácidos idéntica en los dominios extracelulares. Por tanto, la brecha de afinidad es igual a „1" por definición

CLDN18.2xCD3 Constructo de anticuerpo	Afinidad basada en células CLDN18.2 hu [nM]	Brecha de afinidad KD mac/KD hu *
CL-1 x I2C-scFc	56.8 ± 10.7	1
CL-1 x I2C-6His	13.9 ± 1.8	1

En un ensayo de Scatchard separado llevado a cabo en las mismas condiciones, se midió una afinidad basada en células para CLDN18.2 humana de 11.13±2.72 para CL-2 x I2C-scFc en las mismas condiciones.

EJEMPLO 5

Confirmación de la unión a células que expresan CD3 humana / de cyno y CLDN18.2

Para la confirmación de la unión a CLDN18.2 y CD3 humanas y a CD3 de cyno, se sometieron a prueba constructos de anticuerpos de la invención mediante citometría de flujo usando

- células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana,
- la línea celular de leucemia de células T humanas que expresan CD3 HPB-all (DSMZ, Braunschweig, ACC483), y
- la línea de células T que expresan CD3 de cynomolgus LnPx 4119

Para la citometría de flujo, se incubaron 200,000 células de las respectivas líneas celulares durante 60 min a 4°C con el constructo de anticuerpo purificado a una concentración de 5 µg/ml. Tras lavar, se detectaron los constructos de anticuerpos unidos que tenían un dominio Fc con un Fc-gamma-PE de cabra anti-ser humano (1:100) durante 30 min a 4°C. Se detectó el constructo de anticuerpo que tiene una etiqueta de his con un anticuerpo de ratón interno específico para la parte de unión a CD3, seguido por un Fc-gamma-PE de cabra anti-

ratón (1:100) durante 30 min a 4°C. Se midieron las muestras mediante citometría de flujo. Se usaron células CHO no transfectadas como control negativo.

Los resultados se muestran en la figura 5. Los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la invención tiñeron células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana. También se reconocieron líneas de células T humanas y de cyno que expresan CD3 mediante los constructos de anticuerpos. No hubo tinción de células CHO no transfectadas, y tampoco tinción de las células CHO transfectadas con CLDN18.2 mediante el constructo de anticuerpo anti-EGFRvIII xI2C-scFc de control negativo.

EJEMPLO 6

Confirmación de la ausencia de unión a parálogos de CLDN18.2 humana

Se transfectaron de manera estable parálogos de CLDN18.2 humana CLDN18.1, CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 en células CHO. Las secuencias de los parálogos tal como se usan en el presente ejemplo se representan en SEQ ID No: 4-10. Se confirmó la expresión de proteínas en análisis de FACS con anticuerpos específicos para los parálogos respectivos:

CLDN1: disolución madre de rata-anti-ser humano (5 µg/ml final): 100 µg/ml R&D, MAB4618

CLDN2: Ab de ratón interno (1:100-200)

CLDN3: disolución madre de ratón-anti-ser humano (5 µg/ml final): 500 µg/ml R&D, MAB4620

CLDN4: disolución madre de ratón-anti-ser humano (5µg/ml final): 500 µg/ml R&D, MAB4219

CLDN6: disolución madre de ratón-anti ser humano (5µg/ml final): 500 µg/ml R&D, MAB3656

CLDN9: disolución madre de rata-anti-ser humano (5 µg/ml final): 2 mg/ml, antibodies-online.com, ABIN1720917

CLDN18.1: Ab de ratón monoclonal interno (5 µg/ml final)

Se incubaron las células CHO transfectadas durante 60 min a 4°C con el respectivo anticuerpo (véase anteriormente) a una concentración de 5 µg/ml, seguido por el respectivo anticuerpo conjugado con PE de cabra-anti-IgG de ratón, fragmento de Fc-gamma conjugado con PE (1:100), Jackson 115-116-071 o de cabra-anti-IgG de rata, fragmento de Fc-gamma conjugado con PE (1:100) Jackson, 112-116-071 durante 30 min a 4°C.

El ensayo de citometría de flujo se llevó a cabo tal como se describió en el ejemplo 5. Los resultados se muestran en la figura 6. El análisis confirmó que el constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 de la invención que se sometió a prueba en este ensayo no reacciona de manera cruzada con los parálogos de CLDN18.2 humana.

EJEMPLO 7

Actividad citotóxica

Se analizó la potencia de los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la invención en la redirección de células T efectoras contra células diana que expresan CLDN18.2 en diferentes ensayos de citotoxicidad *in vitro*:

- 5 • La potencia de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en la redirección de células T efectoras CD8⁺ humanas estimuladas contra células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas.
- 10 • La potencia de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en la redirección de una línea de células T de macaco contra células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas.
- 15 • La potencia de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en la redirección de las células T en PBMC humanas no estimuladas contra células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana (junto con un control negativo usando células CHO transfectadas con CLDN18.1 humana) se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas.
- 20 • La potencia de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en la redirección de las células T en PBMC humanas no estimuladas contra una línea de cáncer gástrico humano positiva para CLDN18.2 tal como SNU-601 o SNU-620 se midió en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas.

EJEMPLO 7.1

Ensayo de liberación de cromo con células T humanas estimuladas

Se obtienen células T estimuladas enriquecidas en células T CD8⁺ tal como sigue: Se recubre una placa petri (145 mm de diámetro) con un anticuerpo específico anti-CD3 disponible comercialmente (OKT3, Orthoclone) en una concentración final de 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Se elimina la proteína no unida mediante una etapa de lavado con PBS. Se añaden 3-5 x 10⁷ PBMC humanas a la placa petri recubierta previamente en 120 ml de RPMI 1640 con glutamina estabilizada / FCS al 10% / IL-2 20 U/ml y se estimulan durante 2 días. El tercer día, se recogen las células y se lavan una vez con RPMI 1640. Se añade IL-2 hasta una concentración final de 20 U/ml, y se cultivan de nuevo las células durante un día en el mismo medio de cultivo celular que anteriormente. Se enriquecen linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) mediante agotamiento de células T CD4⁺ y células NK CD56⁺ usando Dynal-Beads según el protocolo del fabricante.

Se lavan dos veces células diana CHO transfectadas con CLDN18.2 humana con PBS y se marcan con 11.1 MBq de ⁵¹Cr en un volumen final de 100 µl de RPMI con FCS al 50% durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, las células diana marcadas se lavan 3 veces con

5 ml de RPMI y se usan entonces en el ensayo de citotoxicidad. El ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 200 μ l de RPMI complementado con una razón de E:T de 10:1. Se usan una concentración de partida de 0.01 - 1 μ g/ml de constructo de anticuerpo purificado y diluciones de tres veces de la misma. El tiempo de incubación para el ensayo es de 18 horas. Se determina la citotoxicidad como valores relativos de cromo liberado en el sobrenadante en relación con la diferencia de lisis máxima (adición de Triton-X) y lisis espontánea (sin células efectoras). Todas las mediciones se realizan por cuadruplicado. La medición de la actividad de cromo en los sobrenadantes se realiza en un contador gamma. El análisis de los resultados se lleva a cabo con un software apropiado. Los valores de CE_{50} calculados mediante el programa de análisis a partir de las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis se usan para la comparación de la actividad citotóxica.

EJEMPLO 7.2

Ensayo de citotoxicidad basado en FACS con PBMC humanas no estimuladas

Aislamiento de células efectoras

Se prepararon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos (capas leucocíticas). Se prepararon PBMC el día de la recogida de sangre. Tras la centrifugación en densidad de Ficoll y lavados extensos con PBS de Dulbecco, se eliminaron los eritrocitos restantes de las PBMC por medio de incubación con tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 155 mM, $KHCO_3$ 10 mM, EDTA 100 μ M). Se eliminaron las plaquetas por medio del sobrenadante tras la centrifugación de PBMC a 100 x g. Los linfocitos restantes abarcan principalmente linfocitos B, linfocitos T, células NK y monocitos. Se mantuvieron las PBMC en cultivo a 37°C / el 5% de CO_2 en medio RPMI con FCS al 10%.

Agotamiento de células $CD14^+$ y $CD56^+$

Para el agotamiento de células $CD14^+$, se usaron MicroBeads de $CD14$ humana (Miltenyi Biotec, MACS, n.º 130-050-201). Para el agotamiento de células NK, se usaron MicroBeads de $CD56$ humana (Miltenyi Biotec, MACS, n.º 130-050-401). Se contaron las PBMC y se centrifugaron durante 10 min a temperatura ambiente con 300xg. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en tampón de aislamiento de MACS (80 μ l/ 10^7 células; PBS, FBS al 0.5% (v/v), EDTA 2 mM). Se añadieron MicroBeads de $CD14$ y MicroBeads de $CD56$ (20 μ l/ 10^7 células) y se incubaron durante 15 min a 4-8°C. Se levaron las células con tampón de aislamiento de MACS (1-2 ml/ 10^7 células). Tras la centrifugación (véase anteriormente), se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en tampón de aislamiento de MACS (500 μ l/ 10^8 células). Entonces se aislaron células negativas para $CD14/CD56$ usando columnas LS (Miltenyi Biotec, n.º 130-042-401). Se cultivaron PBMC sin células $CD14^+/CD56^+$ en medio RPMI completo (es decir, RPMI1640 complementado con

FBS al 10%, 1x aminoácidos no esenciales, tampón Hepes 10 mM, piruvato de sodio 1 mM y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina) a 37°C en un incubador hasta que se necesitaran.

Marcaje de células diana

Para el análisis de lisis celular en ensayo de citometría de flujo, se usó el colorante de membrana fluorescente DiOC₁₈ (DiO) (Molecular Probes) para marcar células diana (tales como células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana) y distinguirlas de las células efectoras. Brevemente, se recogieron células, se lavaron una vez con PBS y se ajustaron a 10⁶ células/ml en PBS que contenía FBS al 2% (v/v) y el colorante de membrana DiO (5 µl/10⁶ células). Tras la incubación durante 3 min a 37°C, se lavaron las células dos veces en medio RPMI completo, y se ajustó el número de células a 1.25 x 10⁵ células/ml. Se determinó la vitalidad de las células usando disolución de EosinG isotónica al 0.5% (v/v).

Análisis basado en citometría de flujo

Este ensayo se diseñó para cuantificar la lisis de células diana (tales como células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana) en presencia de diluciones en serie de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3. Se mezclaron volúmenes iguales de células efectoras y células diana marcadas con DiO (es decir, PBMC sin células CD14⁺), dando como resultado una razón de células E:T de 10:1. Se transfirieron 160 µl de esta suspensión a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 40 µl de diluciones en serie de los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 que iban a analizarse (y posiblemente un constructo de anticuerpo de control negativo tal como un constructo de anticuerpo biespecífico basado en (I2C) anti-CD3 que reconoce un antígeno diana irrelevante) o medio RPMI completo como control negativo adicional. La reacción citotóxica mediada por constructo de anticuerpo avanzó durante 48 horas en un incubador humidificado con el 7% de CO₂. Entonces se transfirieron las células a una nueva placa de 96 pocillos y se monitorizó la pérdida de la integridad de la membrana de células diana añadiendo yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 1 µg/ml. PI es un colorante impermeable para la membrana que normalmente se excluye de células viables, mientras que las células muertas lo captan y se vuelven identificables mediante emisión de fluorescencia.

Se midieron muestras mediante citometría de flujo en un instrumento FACSCanto II y se analizaron mediante el software FACSDiva (ambos de Becton Dickinson). Se identificaron las células diana como células positivas para DiO. Se clasificaron las células diana negativas para PI como células diana vivas. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad según la siguiente fórmula:

$$\text{Citotoxicidad [\%]} = \frac{n_{\text{células diana muestras}}}{n_{\text{células diana}}} \times 100$$

n = número de acontecimientos

Usando el software Prism (GraphPad Software Inc.), se representó gráficamente el porcentaje de citotoxicidad frente a las correspondientes concentraciones de constructo de anticuerpo. Se analizaron curvas de respuesta a la dosis con los modelos de regresión logística de cuatro parámetros para la evaluación de las curvas sigmoideas de respuesta a la dosis con una pendiente fija y se calcularon los valores de CE_{50} .

EJEMPLO 7.3

Potencia de redirección de PBMC humanas no estimuladas contra células diana

Se analizó la actividad citotóxica de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en un ensayo de citotoxicidad de 48 h basado en FACS usando PBMC humanas no estimuladas (neg. para CD14 / neg. para CD56) como células efectoras y usando como células diana en una razón de E:T de 10:1:

- (1) células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana,
- (2) células CHO transfectadas con CLDN18.1 humana, y
- (3) líneas celulares expensoras naturales SNU-601 y SNU-620.

El ensayo se llevó a cabo tal como se describió en el ejemplo 7.2 anteriormente. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Valores de CE_{50} [pM] de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 tal como se miden en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con PBMC humanas no estimuladas como células efectoras. Células diana: (1) células CHO transfectadas con CLDN18.2 hu; (2) células CHO transfectadas con CLDN18.1 hu; (3) SNU-601; (4) SNU-620.

Células diana	CLDN18.2xCD3 Constructo de anticuerpo	CE_{50} [pM]
(1)	CL-1 x I2C-scFc	5.2
(1)	CL-1 x I2C-6His	0.5
(2)	CL-1 x I2C-scFc	99396
(2)	CL-1 x I2C-6His	1985
(3)	CL-1 x I2C-scFc	104
(3)	CL-1 x I2C-6His	2.3
(4)	CL-1 x I2C-scFc	185
(4)	CL-1 x I2C-6His	12

El ensayo demuestra que los constructos de anticuerpos de la invención no presentan una actividad citotóxica no deseada contra células CHO transfectadas con el parálogo de CLDN18.2 CLDN18.1 (filas resaltadas en gris). En el caso del constructo denominado "CL-1 x I2C-6His", el factor entre el valor de CE_{50} para CLDN18.2-CHO y el valor de CE_{50} para CLDN18.1-CHO es casi de 4,000. Además, en el caso del constructo denominado "CL-1 x

I2C-scFc", el factor entre el valor de CE_{50} para CLDN18.2-CHO y el valor de CE_{50} para CLDN18.1-CHO es casi de 20,000.

Habitualmente, se espera que los valores de CE_{50} sean menores cuando se usan células diana que expresan niveles superiores de CLDN18.2 en la superficie celular en comparación con células diana que tiene una tasa de expresión de la diana inferior. Por tanto, se observa habitualmente, y se demuestra en el presente ensayo, que el uso de células CHO transfectadas con CLDN18.2 tiene una tendencia a dar como resultado valores de CE_{50} inferiores en comparación con el uso de expresores naturales.

EJEMPLO 7.4

Potencia de redirección de PBMC humanas contra células diana expresoras naturales

Se comparó la actividad citotóxica de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 de la invención contra otros constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 que se unen a un epítipo diferente dentro de la diana CLDN18.2 (CL-3 y CL-4, véase el ejemplo 2). Líneas celulares de cáncer que expresan de manera estable niveles endógenos de CLDN18.2 (GSU, NUGC, IM95, SNU620, SNU601) y la línea celular de control negativo de CLDN18.2 AGS se marcaron de manera estable con luciferasa (Luc). Además, se transfectaron de manera estable células CHO para que sobreexpresaran CLDN18.2. Se usaron dos donadores de células T humanas como fuente de células efectoras. La razón de E:T del ensayo de citotoxicidad fue de 10:1. La titulación en serie 1:3 de los constructos de anticuerpos comenzó a una concentración de 30 nM. Los ensayos se incubaron durante 48 h a 37°C. Se realizó la lectura de citotoxicidad mediante el sistema de ensayo de luciferasa ONE-Glo™ (Promega) para células marcadas con Luc y el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-Glo™ (Promega) para células CHO transfectadas con CLDN18.2.

Con la excepción de las secuencias para las regiones VH y VL anti-CLDN18.2, los constructos de anticuerpos CL-3 y CL-4 eran idénticos a los constructos de anticuerpos de la invención analizados en los ensayos de citotoxicidad del presente ejemplo. Las regiones VH y VL de los dos constructos de anticuerpos CL-3 y CL-4 se dan a conocer como SEQ ID NO: 8+15 y las SEQ ID NO: 6+11, respectivamente, del documento WO 2014/075788. Véanse también SEQ ID NO: 145+146 y las SEQ ID NO: 150+151 tal como se dan a conocer en la presente.

Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación y en la figura 7. Independientemente de de las células diana, se mostró que los constructos de anticuerpos de la presente invención (en este caso: CL-1, CL-2) tenían una potencia citotóxica significativamente mayor que los constructos de anticuerpos que se unen a un epítipo de CLDN18.2 diferente (CL-3, CL-4). Aunque los constructos de anticuerpos de la presente invención presentan valores de CE_{50} en el intervalo picomolar de dos dígitos, los constructos

comparativos presentan valores de CE_{50} en el intervalo picomolar de tres dígitos hasta cinco dígitos. Ninguno de los constructos mostró ninguna actividad contra la línea celular negativa para la diana (datos no mostrados).

Tabla 5: Valores de CE_{50} [pM] de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 tal como se miden en un ensayo de citotoxicidad de 48 horas

Célula diana	CL-1 x I2C-scFc	CL-2 x I2C-scFc	CL-3 x I2C-scFc	CL-4 x I2C-scFc
GSU	7.4 ± 0.3	12.1 ± 0.7	360.3 ± 47.2	1655.5 ± 71.5
IM95	16.0 ± 2.7	21.4 ± 4.2	623.1 ± 93.3	5900.0 ± 514.0
NUGC4	117.1 ± 46.2	97.1 ± 35.1	1196.5 ± 426.4	>30000
SNU-601	61.9 ± 6.9	64.7 ± 6.7	13797.5 ± 4169.5	>30000
SNU-620	29.0 ± 3.6	31.0 ± 5.3	557.1 ± 98.4	11093.5 ± 1996.5
CHO-CLDN18.2	13.6 ± 0.1	13.2 ± 0.5	440.2 ± 112.5	3181.0 ± 119.0

Con el fin de excluir que estas observaciones se debieran a una afinidad significativamente superior de los constructos de anticuerpos de la presente invención (en este caso: CL-1, CL-2) en comparación con los constructos de control (en este caso: CL-3), se llevó a cabo un ensayo de afinidad basado en células con células CHO transfectadas con CLDN18.2 hu. Se mostró que las afinidades de los tres constructos sometidos a prueba CL-1, CL-2 y CL-3 estaban en un intervalo muy similar. Esto significa que la relación de epítipo / actividad favorable demostrada para los constructos de anticuerpos de la presente invención no se debe a que los constructos de control simplemente tienen una afinidad inferior y que presentan por tanto una actividad citotóxica inferior. En su lugar, la potencia parece deberse al epítipo particular dentro de CLDN18.2 que reconocen los presentes constructos de anticuerpos.

EJEMPLO 7.5

Potencia de redirección de células T de macaco contra células CHO que expresan CLDN18.2

Se analizó la actividad citotóxica de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 h usando células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana como células diana, y la línea de células T de macaco 4119LnPx (Knappe et al. Blood 95:3256-61 (2000)) como fuente de células efectoras a una razón de E:T de 10:1. Obsérvese que CLDN18.2 humana y de cynomolgus comparten la secuencia de aminoácidos idéntica en los dominios extracelulares. El marcaje de células diana

de células CHO transfectadas y el análisis basado en citometría de flujo de la actividad citotóxica se realizó tal como se describió en el ejemplo 7.2 anteriormente.

Los resultados se muestran en la tabla 6. Se indujeron células T de macaco de la línea celular 4119LnPx para que destruyeran eficazmente células CHO transfectadas con CLDN18.2 mediante constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 según la invención. Los constructos de anticuerpos presentaban de manera potente valores de CE_{50} picomolares de 1 dígito a 2 dígitos en este ensayo, confirmando que son muy activos en el sistema de macaco.

Tabla 6: Valores de CE_{50} [pM] de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 tal como se miden en un ensayo de citotoxicidad basado en FACS de 48 horas con la línea de células T de macaco 4119LnPx como células efectoras y células CHO transfectadas con CLDN18.2 humana como células diana.

Constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3	CE_{50} [pM]
CL-1 x I2C-scFc	38
CL-1 x I2C-6His	7.2

EJEMPLO 8

Conversión de monómero a dímero tras (i) tres ciclos de congelación/descongelación y (ii) 7 días de incubación a 37°C

Se sometieron constructos de anticuerpos monoméricos frente a CLDN18.2xCD3 a diferentes condiciones de estrés seguido por SEC de alta resolución para determinar el porcentaje de constructo de anticuerpo inicialmente monomérico que se había convertido en constructo de anticuerpo dimérico.

(i) Se ajustaron 25 µg de constructo de anticuerpo monomérico a una concentración de 250 µg/ml con tampón de formulación genérico y luego se congelaron a -80°C durante 30 min seguido por descongelación durante 30 min a temperatura ambiente. Tras tres ciclos de congelación/descongelación, se determinó el contenido de dímero mediante HP-SEC.

(ii) Se ajustaron 25 µg de constructo de anticuerpo monomérico a una concentración de 250 µg/ml con tampón de formulación genérico seguido por incubación a 37°C durante 7 días. El contenido de dímero se determinó mediante HP-SEC.

Se conectó una columna de cromatografía de líquidos de exclusión molecular (SEC) a base de sílice de alta resolución (HP) a un FPLC equipado con un inyector automático. El tampón de ejecución y equilibrado de la columna consistía en KH_2PO_4 100 mM – Na_2SO_4 200 mM ajustado a pH 6.6. Se aplicó la disolución de constructo de anticuerpo (25 µg de proteína) a la columna equilibrada y se llevó a cabo la elución a una velocidad de flujo de 0.75 ml/min a una presión máxima de 7 MPa. Se monitorizó la ejecución completa a una absorbancia óptica

de 280, 254 y 210 nm. Se realizó el análisis mediante integración de picos de la señal de 210 nm registrada en la hoja de evaluación de la ejecución de software. Se calculó el contenido de dímero dividiendo el área del pico de dímero entre el área total del pico de monómero más dímero.

5 Los resultados se muestran en la Tabla 7 siguiente. Los constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 analizados presentaban porcentajes de dímero del 0.0% tras tres ciclos de congelación/descongelación, y porcentajes de dímero de $\leq 2\%$ tras 7 días de incubación a 37°C.

10 **Tabla 7:** Porcentaje de constructos de anticuerpos frente a CLDN18.2xCD3 monoméricos frente a diméricos tal como se determina mediante cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (HP-SEC).

CLDN18.2xCD3 Constructo de anticuerpo	Porcentaje de dímero tras tres ciclos de congelación/descongelación	Porcentaje de dímero tras 7 días de incubación a 37°C
CL-1 x I2C-scFc	0.0	0.0
CL-1 x I2C-6His	0.72	0.0

EJEMPLO 9

Termoestabilidad

20 Se determinó la temperatura de agregación de los anticuerpos tal como sigue: Se transfieren 40 µl de disolución de constructo de anticuerpo a una concentración de 250 µg/ml a una cubeta de un solo uso y se coloca en un dispositivo de dispersión de luz dinámica. Se calentó la muestra de 40 °C a 70 °C a una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min con adquisición constante del radio medido. El aumento del radio que indica la fusión de la proteína y la agregación lo usó el paquete de software suministrado con el dispositivo de DLS para calcular la temperatura de agregación del constructo de anticuerpo.

25 Se mostró que el constructo de anticuerpo CL-1 x I2C-scFc tenía una temperatura de agregación beneficiosa de $\geq 51^\circ\text{C}$, más específicamente, de 51.7°C . En un ensayo separado, la temperatura de agregación de la molécula denominada CL-1 x I2C-6His se mostró que tenía un valor de $\geq 45^\circ\text{C}$, más específicamente, de 49.7°C .

Ejemplo 10

Turbidez de una concentración del constructo de anticuerpo monomérico de 2.5 mg/ml

35 Se concentró 1 ml de disolución de constructo de anticuerpo purificado de una concentración de 250 µg/ml mediante unidades de concentración por centrifugación hasta 2500 µg/ml. Tras 16 h de almacenamiento a 5°C, se determinó la turbidez de la disolución

mediante medición de la absorción óptica a OD340 nm frente al tampón de formulación genérico.

Se mostró que el constructo de anticuerpo CL-1 x I2C-scFc tenía una turbidez muy favorable de ≤ 0.021 , mientras que se mostró que CL-1 x I2C-6His tenía una turbidez muy favorable de ≤ 0.029 . Una medición similar de la turbidez tras tres ciclos de congelación/descongelación dio como resultado una turbidez de 0.021 para CL-1 x I2C-scFc.

EJEMPLO 11

Homogeneidad de proteínas mediante cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución

Se analizó la homogeneidad de proteínas de los constructos de anticuerpos de la invención mediante cromatografía de intercambio catiónico de alta resolución (CIEX).

En un ensayo, se diluyeron 50 μ g de monómero de constructo de anticuerpo con 50 ml de tampón de unión A (dihidrogenofosfato de sodio 20 mM, NaCl 30 mM, octanato de sodio al 0.01%, pH 5.5), y se aplicaron 40 ml de esta disolución a una columna BioPro SP-F de 1 ml (YMC, Alemania) conectada a un dispositivo de FPLC. Tras la unión de la muestra, se llevó a cabo una etapa de lavado con tampón de unión adicional. Para la elución de la proteína, se aplicó un gradiente salino creciente lineal usando tampón B (dihidrogenofosfato de sodio 20 mM, NaCl 1000 mM, octanato de sodio al 0.01%, pH 5.5) hasta el 50% de tampón B a lo largo de 10 volúmenes de columna. Se monitorizó la ejecución completa a una absorbancia óptica de 280, 254 y 210 nm. Se realizó el análisis mediante integración de picos de la señal de 280 nm registrada en la hoja de evaluación de la ejecución de software. En este ensayo, se mostró que la homogeneidad de la molécula denominada "CL-1 x I2C-6His" (SEQ ID NO: 131) tenía un valor del 82.5%.

En otro ensayo, se conectó una columna de CIEX analítica Bio SCX (Agilent, Frankfurt, Alemania) a un dispositivo de UPLC (Waters, Eschborn, Alemania) y se equilibró con tampón A (tampón de unión) que consistía en MES 50 mM, pH 5.6, azida de sodio al 0.05%. Se aplicaron 10 μ g de monómero de constructo de anticuerpo a la columna y se unió a la matriz de la columna. Tras la unión de la muestra, se llevó a cabo una etapa de lavado con tampón B de unión adicional. Para la unión de la elución de la proteína, se aplicó un gradiente salino creciente lineal usando tampón B que consistía en MES 50 mM, cloruro de sodio 1000 mM, pH 5.6, azida de sodio al 0.05% hasta el 50% de tampón B. Se monitorizó la ejecución completa a una absorbancia óptica de 280 nm. Se realizó el análisis mediante integración de picos de la señal de 280 nm registrada en la hoja de evaluación de la ejecución de software. En este ensayo, se mostró que la molécula denominada "CL-1 x I2C-scFc" (SEQ ID NO: 132) tenía una homogeneidad el 97.6% (área bajo la curva (= AUC) del pico principal).

EJEMPLO 12

Hidrofobicidad de superficie tal como se mide mediante HIC butilo

Se sometió a prueba la hidrofobicidad de superficie de los constructos de anticuerpos CL-1 x I2C-scFc y CL-1 x I2C-6His en cromatografía de interacción hidrófoba HIC en modo de flujo pasante.

Se diluyeron 50 µg de constructo de anticuerpo monomérico con tampón de formulación genérico hasta un volumen final de 500 µl (ácido cítrico 10 mM, lisina HCl 75 mM, trehalosa al 4%, pH 7.0) y se aplicaron a una columna de butil Sepharose FF de 1 ml conectada a un sistema de FPLC Äkta Purifier. Se monitorizó la ejecución completa a una absorbancia óptica de 280, 254 y 210 nm. Se realizó el análisis mediante integración de picos de la señal de 280 nm registrada en la hoja de evaluación de la ejecución de software Äkta Unicorn. Se evaluó el comportamiento de elución comparando el área y la velocidad de aumento y disminución de la señal de proteína indicando de ese modo la fuerza de la interacción del constructo de anticuerpo con la matriz.

El constructo de anticuerpo tenía un buen comportamiento de elución, que era rápida y completa.

EJEMPLO 13

Evaluación de la eficacia de un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 en un modelo de cáncer gástrico en estadio avanzado GSU-luc en ratones NOD/SCID

La actividad antitumoral del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 que tenía SEQ ID NO: 132 (CL-1 x I2C-scFc) se sometió a prueba en un modelo de ratones NOD/SCID hembra en los que se inyectaron por vía subcutánea el día 1 5×10^6 células GSU-luc (luciferasa). Se inyectaron por vía intraperitoneal 2×10^7 células efectoras (células T CD3+ humanas expandidas *in vitro* y activadas) el día 8. El tratamiento se produjo en los días 12, 19 y 26 (Q7Dx3). Se trataron dos grupos de control, uno sin células T (grupo 1), otro con células T (grupo 2) con 0.1 ml/admin. de vehículo (L-lisina 25 mM, polisorbato 80 a 0.002% (p/v) en cloruro de sodio al 0.9% (p/v) pH 7.0) mediante inyecciones en bolo intravenosas. El constructo de anticuerpo se administró a una concentración de 1 mg/kg/admin. mediante inyecciones en bolo intravenosas en un volumen final de 0.1 ml (grupo 3). El número de ratones por grupo era de 5 (grupo 1), 10 (grupo 2) y 10 (grupo 3).

Se midieron los tumores mediante un calibre durante el estudio y se evaluó el progreso mediante comparación entre grupos de los volúmenes tumorales (TV). La inhibición del crecimiento tumoral T/C [%] el día x se determina calculando el volumen tumoral como $T/C (\%) = 100 \times (\text{mediana de TV del grupo analizado}) / (\text{mediana de TV del grupo de control})$, y los valores calculados se representan en la tabla 8.

Tabla 8: Valores de T/C [%] del modelo de cáncer gástrico en estadio avanzado GSU-luc en ratones NOD/SCID. "Mediana" = mediana del volumen tumoral del grupo analizado.

Día de	Grupo 2	Grupo 3
--------	---------	---------

estudio	Mediana	n	T/C [%]	Mediana	n	T/C [%]
11	208	10	100	208	10	100
13	275	10	100	316	10	115
15	430	10	100	369	10	86
18	695	10	100	185	10	27
20	891	10	100	123	10	14
22	896	4	100	79	10	9
25	1373	2	100	52	9	4

Los resultados se muestran además en la figura 8. Se mostró una inhibición del crecimiento tumoral significativa en el modelo de ratón NOD/SCID en el presente análisis de tumor en estadio avanzado. Además, el tratamiento con el constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 no tuvo efecto sobre el peso corporal de los ratones (datos no mostrados).

EJEMPLO 14

Evaluación de la actividad antitumoral de un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 en un modelo de xenoinjerto de formación de tumor SNU620-luc en ratones desnudos atímicos hembra

La actividad antitumoral del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 que tenía SEQ ID NO: 132 (CL-1 x I2C-scFc) se sometió a prueba en un modelo de ratones desnudos atímicos hembra en los que se inyectó por vía subcutánea el día 1 una mezcla de SNU620-luc (5×10^6 células diana) / PBMC (2.5×10^6 células efectoras) en matrigel al 50%. El tratamiento de los grupos 1-4 se produjo en los días 3, 10 y 17 (Q7D). El grupo de control que recibió mezcla de tumor / PBMC (grupo 1) se trató con vehículo (L-lisina 25 mM, polisorbato 80 al 0.002% (p/v) en cloruro de sodio al 0.9% (p/v) pH 7.0) a 0.1 ml/admin. mediante inyecciones en bolo intravenosas. El constructo de anticuerpo se administró a una concentración de 1 mg/kg/admin. (grupo 2), 0.1 mg/kg/admin. (grupo 3) y 0.01 mg/kg/admin. (grupo 4) en inyecciones en bolo intravenosas a un volumen de 0.1 ml. El número de ratones por grupo era de 10.

Se midieron los tumores mediante un calibre durante el estudio y se evaluó el progreso mediante comparación entre grupos de los volúmenes tumorales (TV). La inhibición del crecimiento tumoral T/C [%] el día x se determina calculando el volumen tumoral como $T/C (\%) = 100 \times (\text{mediana de TV del grupo analizado}) / (\text{mediana de TV del grupo de control})$, y los valores calculados se representan en la tabla 9.

Tabla 9: Valores de T/C [%] del modelo de xenoinjerto de formación de tumor SNU620-luc en ratones desnudos atímicos hembra. "Mediana" = mediana del volumen tumoral del grupo analizado.

Día	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
-----	---------	---------	---------	---------	---------

	Mediana	T/C [%]	Mediana	T/C [%]	Mediana	T/C [%]	Mediana	T/C [%]	Mediana	T/C [%]
5	142	100	97	68	107	76	148	104	156	110
8	196	100	53	27	96	49	110	56	180	91
10	231	100	34	15	51	22	83	36	217	94
12	274	100	21	8	29	11	46	17	168	61
15	321	100	13	4	19	6	27	8	70	22
17	353	100	10	3	13	4	21	6	44	12
19	448	100	8	2	11	2	16	4	53	12
22	552	100	7	1	10	2	15	3	64	12

Los resultados se muestran además en la figura 9. Se mostró una inhibición del crecimiento tumoral significativa en el modelo de ratón desnudo atímico con todas las concentraciones sometidas a prueba del constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3. Además, el tratamiento con el constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 no tuvo efecto sobre el peso corporal de los ratones (datos no mostrados).

EJEMPLO 15

Estudio de toxicología exploratorio en cyno

Se llevó a cabo un estudio de tolerabilidad en NHP con un constructo de anticuerpo frente a CLDN18.2xCD3 CL-1 x I2C-6His (SEQ ID NO: 131) mediante administración intravenosa. Las exposiciones sistémicas logradas tras la dosis de partida de 25 µg/kg/día (~20x la CE90 humana) se toleraron bien. La escalada de la dosis hasta 125 µg/kg /día (~120x la CE90 humana) dio como resultado efectos clínicos así como histopatológicos esperados a partir de un constructo de anticuerpo que se acopla a células T que selecciona como diana CLDN18.2

EJEMPLO 16

Estudios de terapia de combinación *in vitro*

El tratamiento con CL-1xI2C-scFc activa células T humanas, conduciendo a la regulación por incremento de PD-1 en células T (datos no mostrados). El tratamiento también puede conducir a regulación por incremento de PD-L1 en células tumorales. Las líneas celulares de cáncer gástrico GSU y NUG-C4 que son positivas para CLDN18.2 se modificaron por ingeniería genética para sobreexpresar PD-L1. Se incubaron las células con CL-1xI2C-scFc, y con células T humanas activadas en ausencia o presencia de un anticuerpo anti-PD-1 que tenía una secuencia de aminoácidos de cadena pesada tal como se representa en SEQ ID NO: 360 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera tal como se representa en SEQ ID NO: 361. Se evaluó la citotoxicidad tras una incubación de 24 h. Los resultados se muestran en la Tabla 10 siguiente.

Tabla 10: Valores de CE₅₀ y CE₉₀ [pM] de dos ensayos de citotoxicidad separados para dos líneas celulares diferentes cada uno

	GSU		NUG-C4	
	CE ₅₀	CE ₉₀	CE ₅₀	CE ₉₀
CL-1xI2C-scFc solo	52.8 ± 9.4	168.0 ± 77.7	168.0 ± 85.1	712 ± 91.7
CL-1xI2C-scFc + ab anti-PD-1	28.1 ± 10.7	83.4 ± 45.0	63.9 ± 57.0	219.9 ± 77.2

Este ensayo demuestra que la adición de un anticuerpo anti-PD-1 aumenta la eficacia de los constructos de anticuerpos frente a CD3xCLDN18.2 de la invención.

EJEMPLO 17

Estudios de terapia de combinación en ratones

Usando un modelo de ratón con introducción de CD3 épsilon quimérica humana/murina, se evaluaron combinaciones terapéuticas de anticuerpos / constructos de anticuerpos para mejorar potencialmente la eficacia de constructos de anticuerpos biespecíficos tal como se describe en la presente. Se generó un constructo de anticuerpo sustituto de cadena sencilla biespecífico anti-CD3 humana ("I2C" scFv) x anti-CLDN18.2 de ratón (scFv)-scFc. Esta molécula demostró una potente actividad contra células que expresan CLDN18.2 de ratón *in vitro*. Entonces se sometió a prueba la molécula en un modelo de ratón inmaduro modificado genéticamente (con introducción de CD3 épsilon quimérica humana/murina) para determinar su actividad antitumoral en combinación con anticuerpos anti-PD-1 de ratón, anti-CTLA4 de ratón y anti-4-1BB de ratón (CD137) contra tumores implantados por vía subcutánea positivos para CLDN18.2 (modelo singénico B16F10 muCLDN18.2). Según el diseño del estudio, se aleatorizaron los ratones el día 10, teniendo un volumen tumoral de aproximadamente 50-100 mm³. Se incluyeron diez ratones en cada grupo. Se administraron (i.v.) el constructo de anticuerpo frente a CD3xCLDN18.2 (150 µg/kg) o un constructo de anticuerpo biespecífico de control (anti-CD3 x anti-EGFRvIII, 150 µg/kg) los días 11 y 18, y se dosificaron los anticuerpos (anti-PD-1 100 µg; anti-4-1BB 150 µg; anti-CTLA4 300 µg; isotipo de anticuerpo como control) los días 11, 14, 17 y 20. Se midieron los volúmenes tumorales los días 10, 13, 17, 20 y 25 (recogida terminal, todos los grupos).

Los tres anticuerpos potenciaron la eficacia del constructo biespecífico. El anticuerpo monoclonal anti-4-1BB agonista no demostró actividad como agente individual contra los tumores positivos para CLDN18.2. Específicamente, se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) el día 25 tal como sigue:

Constructo de anticuerpo biespecífico de control + isotipo de anticuerpo → 0% (convencional)

Constructo de anticuerpo biespecífico de control + ab anti-4-1BB → no significativo

Constructo de anticuerpo biespecífico de control + ab anti-CTLA-4 → 21%

Constructo de anticuerpo frente a CD3xCLDN18.2 + isotipo de anticuerpo → 36%

Constructo de anticuerpo biespecífico de control + ab anti-PD-1 → 57%

5 Constructo de anticuerpo frente a CD3xCLDN18.2 + ab anti-CTLA-4 → 76%

Constructo de anticuerpo frente a CD3xCLDN18.2 + ab anti-4-1BB → 77%

Constructo de anticuerpo frente a CD3xCLDN18.2 + ab anti-PD-1 → 79%

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25

30

35