

MOLÉCULAS DE UNIÓN A CLAUDINA-6 Y USOS DE LAS MISMAS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión
5 a Claudina 6, que incluyen anticuerpos y moléculas de unión a
antígeno, usos de las mismas y similares.

Antecedentes de la Invención

Los anticuerpos están atrayendo la atención como
productos farmacéuticos, ya que son muy estables en el plasma
10 y tienen pocos efectos secundarios. Entre los múltiples
anticuerpos terapéuticos, algunos tipos de anticuerpos
requieren células efectoras para ejercer una respuesta
antitumoral. La citotoxicidad mediada por células dependiente
de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) es una
15 citotoxicidad que presentan las células efectoras contra las
células unidas al anticuerpo mediante la unión de la región Fc
del anticuerpo a los receptores Fc presentes en las células NK
y los macrófagos. Hasta la fecha, se han desarrollado
múltiples anticuerpos terapéuticos que pueden inducir a la ADCC
20 a ejercer eficacia antitumoral como fármacos para el
tratamiento del cáncer (NPL 1).

Además de los anticuerpos que adoptan ADCC mediante
el reclutamiento de células NK o macrófagos como células
efectoras, los anticuerpos de reclutamiento de células T
25 (anticuerpos TR) que adoptan la citotoxicidad al reclutar

células T como células efectoras se conocen desde la década de 1980 (NPL 2 a 4). Un anticuerpo TR es un anticuerpo biespecífico que reconoce y se une a cualquiera de las subunidades que forman un complejo receptor de células T en las células T, en particular la cadena épsilon CD3, y un antígeno en las células cancerosas. Actualmente se están desarrollando varios anticuerpos TR. El catumaxomab, que es un anticuerpo TR contra EpCAM, ha sido aprobado en la UE para el tratamiento de la ascitis maligna. Además, recientemente se ha descubierto que un tipo de anticuerpo TR llamado "acoplador de células T biespecíficas (BiTE)" exhibe una fuerte actividad antitumoral (NPL 5 y 6). Blinatumomab, que es una molécula BiTE contra CD19, recibió la aprobación de la FDA por primera vez en 2014. Se ha demostrado que blinatumomab exhibe una actividad citotóxica mucho más fuerte contra las células cancerosas CD19/CD20 positivas *in vitro* en comparación con Rituximab, que induce anticuerpos dependientes de células mediadas citotoxicidad (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (NPL 7).

Sin embargo, se sabe que un anticuerpo trifuncional se une tanto a una célula T como a una célula como una célula NK o un macrófago al mismo tiempo de una manera independiente de antígenos de cáncer y, como resultado, los receptores expresados en las células son entrelazados, y la expresión de varias citocinas se induce de una manera independiente de

antígeno. Se cree que la administración sistémica de un anticuerpo trifuncional causa efectos secundarios de tipo tormenta de citocinas como resultado de esa inducción de la expresión de citocinas. De hecho, se ha informado que, en el
5 ensayo clínico de fase I, una dosis muy baja de 5 µg/cuerpo fue la dosis máxima de tolerancia para la administración sistémica de catumaxomab a pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, y que la administración de una dosis más alta provoca varios efectos secundarios graves (NPL 8). Cuando
10 se administra en una dosis tan baja, el catumaxomab nunca puede alcanzar el nivel en sangre efectivo. Es decir, el efecto antitumoral esperado no se puede lograr administrando catumaxomab a una dosis tan baja.

Mientras tanto, a diferencia del catumaxomab, una
15 molécula biespecífica de formato sc(Fv)₂ (BiTE) que no tiene un sitio de unión al receptor Fc gamma y, por lo tanto, no reticula los receptores expresados en las células T y células como las células NK y los macrófagos de una manera independiente de antígenos de cáncer. Sin embargo, dado que
20 el sc(Fv)₂ biespecífico es una molécula de anticuerpo de bajo peso molecular modificada sin una región Fc, el problema es que su semivida en sangre después de la administración a un paciente es significativamente más corta que la de los anticuerpos tipo IgG usados convencionalmente como anticuerpos
25 terapéuticos. De hecho, se ha informado que la semivida en

sangre del $sc(Fv)_2$ biespecífico administrado *in vivo* es de aproximadamente varias horas (NPL 9 y 10). El blinatumomab, una molécula $sc(Fv)_2$ que se une a CD19 y CD3, ha sido aprobado para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda. Se ha descrito que la semivida sérica de blinatumomab es inferior a 2 horas en los pacientes (NPL 21). En los ensayos clínicos de blinatumomab, se administró mediante infusión intravenosa continua usando una minibomba. Este método de administración no solo es extremadamente inconveniente para los pacientes, sino que también tiene el riesgo potencial de accidentes médicos debido al mal funcionamiento del dispositivo o similar. Por lo tanto, no se puede decir que tal método de administración sea deseable.

La familia de las claudinas es la familia de proteínas de la membrana celular de aproximadamente 23 kD de peso molecular que tienen cuatro dominios transmembrana y constituyen uniones estrechas. La familia Claudina incluye 24 miembros en humanos y ratones, y se sabe que cada miembro de la familia Claudina exhibe un patrón de expresión muy singular dependiendo de cada tipo de célula epitelial (NPL 11 a 14). En la hoja de células epiteliales, un mecanismo funciona para evitar que las sustancias se filtren (difundan) en los espacios intercelulares, y se ha demostrado que los sistemas de adhesión célula-célula llamados uniones estrechas realmente juegan un papel central como una "barrera" en el mecanismo para evitar

fugas.

Una molécula de unión estrecha Claudina 6 (CLDN6), un miembro de la familia de proteínas Claudina, muestra una expresión transcripcionalmente silenciosa en tejidos adultos normales (NPL 15 y 16), mientras que muestra una regulación positiva en varios tipos de cánceres como el cáncer de ovario, NSCLC y cánceres gástricos (NPL 17 a 19).

Con respecto a los anticuerpos anti-CLDN6, se ha informado que los anticuerpos monoespecíficos contra CLDN6 tienen actividad ADCC o actividad de internalización contra líneas cancerosas positivas para CLDN6 (PTL 1 a 5). Hasta ahora, los anticuerpos biespecíficos de redireccionamiento de células T dirigidos a CLDN6, denominados 6PHU3, se han diseñado usando el formato $sc(Fv)_2$ biespecífico con especificidades anti-CD3/anti-CLDN6 (PTL 6 a 7). En la evaluación preclínica, se ha informado que 6PHU3 muestra una potente destrucción de las células cancerosas *in vitro* e *in vivo* (NPL 20).

Lista de citas

Literatura de patentes

- 20 [PTL 1] WO2009/087978
- [PTL 2] WO2011/057788
- [PTL 3] WO2012/003956
- [PTL 4] WO2012/156018
- [PTL 5] WO2015/069794
- 25 [PTL 6] WO2014/075697

[PTL 7] WO2014/075788

Literatura no de patentes

[NPL 1] Clin Cancer Res. 2010 Ene 1;16(1):11-20.

[NPL 2] Nature. 1985 Abr 18-24;314(6012):628-31.

5 [NPL 3] Int J Cancer. 1988 Abr 15;41(4):609-15.

[NPL 4] Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Mar;83(5):1453-7.

[NPL 5] Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):7021-5.

10 [NPL 6] Drug Discov Today. 2005 Sep 15;10(18):1237-44.

[NPL 7] Int J Cancer. 2002 Ago 20;100(6):690-7.

[NPL 8] Cancer Immunol Immunother. (2007) 56 (10), 1637-44

15 [NPL 9] Cancer Immunol Immunother. (2006) 55 (5), 503-14

[NPL 10] Cancer Immunol Immunother. (2009) 58 (1), 95-109

20 [NPL 11] Furuse y Tsukita, TRENDS in Cell Biology 2006, 16: 181

[NPL 12] Wilcox, *et al.*, Cell 2001, 104: 165

[NPL 13] Rahner, *et al.*, GASTROENTEROLOGY 2001, 120: 411

25 [NPL 14] Morita, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96: 511

[NPL 15] Dev Dyn. 2004 Oct;231(2):425-31.

[NPL 16] Am J Physiol Renal Physiol. 2006 Dic;
291(6):F1132-41.

[NPL 17] Int J Cancer. 2014 Nov 1;135(9):2206-14.

5 [NPL 18] Histopathology. 2012 Dic;61(6):1043-56.

[NPL 19] J Gastrointest Cancer. 2010 Mar;41(1):52-9.

[NPL 20] Oncoimmunology. 2015 Oct 29;5(3):e1091555.

[NPL 21] Nat Rev Drug Discov. 2014 Nov;13(11):799-
801

10 **Breve Descripción de la Invención**

Problema técnico

Como se mencionó anteriormente, el $sc(Fv)_2$ biespecífico es una molécula de anticuerpo de bajo peso molecular modificada sin una región Fc y muestra una semivida
15 en sangre significativamente más corta en comparación con los anticuerpos de tipo IgG, lo que causaría inconvenientes para su uso como fármaco terapéutico. En el caso de $sc(Fv)_2$ biespecífico que se une a CLDN6, denominado 6PHU3, se ha informado que los niveles de proteína plasmática de 6PHU3
20 disminuyeron drásticamente en 6 horas y la actividad citotóxica fue apenas detectable después de 24 horas (Nat Med. 2017 Jul; 23 (7): 815-817.). Además, el formato de $sc(Fv)_2$ enfrenta desafíos de manufactura, incluida la escasa estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo.

25 En un aspecto, el objetivo de la presente invención

es proporcionar moléculas de unión a antígeno (incluyendo anticuerpos) que muestren actividad de unión hacia CLDN6 y al complejo receptor de células T que permitan el tratamiento del cáncer al tener células T cercanas a las células que expresan CLDN6 y usando la citotoxicidad de células T contra células cancerosas que expresen CLDN6, especialmente moléculas de unión a antígeno con alta estabilidad y larga semivida en suero. La provisión de métodos para producir las moléculas de unión a antígeno y la composición farmacéutica que comprende esa molécula de unión a antígeno como ingrediente activo también son objetivos de la presente invención.

En otro aspecto, el objetivo de la presente invención es proporcionar moléculas de unión a antígeno que muestren actividad de unión hacia CLDN6 que permitan el tratamiento del cáncer dirigiéndose a las células que expresan CLDN6, métodos para producir moléculas de unión a antígeno y composición farmacéutica que comprenda tal molécula de unión a antígeno, o inmunoconjugado que comprenda esa molécula de unión a antígeno, como ingrediente activo. El uso de la molécula de unión a antígeno para detectar la presencia de CLDN6 en una muestra biológica y el uso de la molécula de unión a antígeno en el diagnóstico de varios cánceres también se proporcionan en la presente invención.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o

prevención de varios cánceres, que comprenden una de las moléculas de unión a antígeno, o inmunoconjugado, mencionadas anteriormente, como ingrediente activo, y métodos terapéuticos que usan las composiciones farmacéuticas.

5 **Solución al problema**

Los inventores encontraron que las moléculas de unión a antígeno que comprenden una región variable de la cadena pesada (VH) específica junto con una región variable de la cadena ligera (VL) específica que muestra actividad de unión
10 hacia CLDN6, y una segunda VH junto con una segunda VL que muestra actividad de unión hacia el complejo receptor e células T puede dañar las células que expresan CLDN6 y ejercer una actividad citotóxica/antitumoral superior. Las moléculas de unión a antígeno que comprenden secuencias específicas también
15 muestran una estabilidad, seguridad y capacidad de manufactura superiores. La presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno y composiciones farmacéuticas que pueden tratar varios cánceres, especialmente aquellos asociados con CLDN6 tales como tumores positivos a CLDN6, al comprender la
20 molécula de unión a antígeno como ingrediente activo.

Los inventores también encontraron que las moléculas de unión a antígeno que comprenden VH específica junto con VL específica muestran actividad de unión hacia CLDN6 y una especificidad superior hacia CLDN6 humana, tal como resultado,
25 las moléculas de unión a antígeno y sus inmunoconjugados pueden

usarse para dirigirse a células que expresan CLDN6, detectando la presencia de CLDN6 en muestra biológica y diagnóstico de varios cánceres.

Más específicamente, la presente invención
5 proporciona lo siguiente:

[1] Un anticuerpo aislado que comprende:

una primera región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de SEC ID NO: 113, 117 y 118, respectivamente;

10 una primera región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente;

una segunda región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y
15 HVR-H3 de SEC ID NO: 122, 123 y 124, respectivamente; y

una segunda región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOs: 114, 115 y 116, respectivamente.

[2] Un anticuerpo aislado que comprende:

20 una primera región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1, 33 y 84; y una primera región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86 y 88;

25 una segunda región variable de la cadena pesada que

comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 60 y 70; y una segunda región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 61 y 71.

5 [3] El anticuerpo de [1] o [2], en donde la primera región variable de la cadena pesada está enlazada a un primer dominio CH1 que se muestra en SEC ID NO: 95, la primera región variable de la cadena ligera está enlazada a un primer dominio CL mostrado en SEC ID NO: 63, la segunda región variable de la
10 cadena pesada está enlazada a un segundo dominio CH1 mostrado en SEC ID NO: 97, y la segunda región variable de la cadena ligera está enlazada a un segundo dominio CL mostrado en SEC ID NO: 62.

15 [4] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [3], en donde el anticuerpo comprende además cualquiera de las combinaciones de la región Fc seleccionadas de:

 (1) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 72 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 73;

 (2) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 74
20 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 75;

 (3) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 76 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 77; y

 (4) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 78 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 79.

25 [5] El anticuerpo de [4], en donde la primera región

Fc está en la misma cadena de polipéptidos con la primera región variable de la cadena pesada, y la segunda región Fc está en la misma cadena de polipéptidos con la segunda región variable de la cadena pesada.

5 [6] El anticuerpo de cualquiera de [1] a [5], en donde la primera región variable de la cadena pesada y la primera región variable de la cadena ligera forman un primer sitio de unión a antígeno, y la segunda región variable de la cadena pesada forma un segundo sitio de unión a antígeno.

10 [7] Un anticuerpo aislado que comprende:
una primera cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 104, 105, 106 y 107 y una primera cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 112;

15 una segunda cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 108, 109, 110 y 111 y una segunda cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 98.

20 [8] El anticuerpo de [7], en donde las regiones variables de la primera cadena pesada y la primera cadena ligera forman un primer sitio de unión a antígeno, y las regiones variables de la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera forman un segundo sitio de unión a antígeno.

25 [9] El anticuerpo de [6] o [8], en donde el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6.

[10] El anticuerpo de cualquiera de [6], [8] y [9], en donde el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana.

5 [11] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [10], en donde el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NOs: 125 o 126.

[12] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [11], en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une
10 sustancialmente a CLDN9 humana.

[13] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [12], en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN4 humana.

[14] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [13],
15 en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN3 humana.

[15] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [14], en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en SEC ID
20 NO: 134.

[16] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [15], en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CD3.

[17] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [16],
25 en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad

de unión hacia la cadena épsilon de CD3.

[18] El anticuerpo de cualquiera de [6] y [8] a [17], en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CD3 humano como se define en SEC ID NO: 142.

5 [19] Un ácido nucleico aislado que codifica para el anticuerpo de cualquiera de [1] a [18].

[20] Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico de [19].

[21] Un método para producir un anticuerpo que
10 comprende cultivar la célula hospedera de [20] para que se produzca el anticuerpo.

[22] El método de [21], que comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula hospedera.

[23] Una composición farmacéutica que comprende el
15 anticuerpo de cualquiera de [1] a [18] y un portador farmacéuticamente aceptable.

[24] La composición farmacéutica de [23], que induce citotoxicidad dependiente de células T.

[25] La composición de [23] o [24], que es una
20 composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

[26] La composición de cualquiera de [23] a [25], que es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de
25 células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

[27] Uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [18] en la manufactura de un medicamento.

[28] Uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [18] en la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o
5 prevención del cáncer.

[29] Uso del anticuerpo de cualquiera de [1] a [18] en la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

10 [30] Un método para tratar a un individuo que tenga cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de [1] a [18].

[31] Un método para tratar a un individuo que tenga cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas,
15 cáncer gástrico o cáncer de hígado que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de [1] a [18].

[32] Un kit para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende al menos el anticuerpo de
20 cualquiera de [1] a [18], e instrucciones de uso.

[33] Un kit para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado, que comprende al menos el anticuerpo de cualquiera de [1] a [18], e
25 instrucciones de uso.

Además, la presente invención también proporciona lo siguiente:

[34] Una molécula de unión a antígeno que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que
5 comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; y

10 (a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85;

y

15 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; y
20

(b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54, 82, 86, 88 y 58.

25 [35] La molécula de unión a antígeno de [34], en

donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden estructuras de ratón, conejo, humanizadas o humanas.

[36] Una molécula de unión a antígeno que comprende
5 una región variable de la cadena pesada que comprende una
secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1,
33, 84, 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49,
50, 55, 56, 64, 65, 83 y 57, y una región variable de la cadena
ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada
10 de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86, 88, 92, 41, 42, 46, 51, 52, 53,
54, 82 y 58.

[37] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
de [34] a [36], en donde la región variable de la cadena pesada
y la región variable de la cadena ligera forman un sitio de
15 unión a antígeno.

[38] La molécula de unión a antígeno de [37], en
donde el sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión
hacia CLDN6.

[39] La molécula de unión a antígeno de [37] o [38],
20 en donde el sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión
hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NO: 125 o 126.

[40] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
de [37] a [39], en donde el sitio de unión a antígeno no se
une sustancialmente a CLDN9 humana.

25 [41] La molécula de unión a antígeno de cualquiera

de [37] a [40], en donde el sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN4 humana.

[42] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [37] a [41], en donde el sitio de unión a antígeno no se
5 une sustancialmente a CLDN3 humana.

[43] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [37] a [42], en donde el sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en SEC ID NO: 134.

10 [44] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [43] en donde la molécula de unión a antígeno comprende además una región Fc de anticuerpo.

[45] La molécula de unión a antígeno de [44], en donde la región Fc es una región Fc con al menos una mutación
15 de aminoácido en cualquiera de las regiones Fc que constituyen los aminoácidos de SEC ID NOs: 143 a 146 (IgG1 a IgG4).

[46] La molécula de unión a antígeno de [44] o [45], en donde la región Fc es una región Fc a la que se une la cadena de azúcar, y el porcentaje de cadena de azúcar
20 deficiente en fucosa unida a la región Fc es mayor que el de una región Fc de IgG nativa, o el porcentaje de N-acetilglucosamina bisectante añadido a la región Fc es mayor que el de una región Fc de IgG nativa.

[47] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
25 de [34] a [46], en donde la molécula de unión a antígeno tiene

actividad citotóxica.

[48] La molécula de unión a antígeno de [47], en donde la actividad citotóxica es ADCC o CDC.

[49] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [46], en donde la molécula de unión a antígeno tiene actividad internalizante.

[50] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [49] que está conjugada con un agente citotóxico.

[51] Un inmunoconjugado que comprende la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] y un agente citotóxico.

[52] Una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51], y un portador farmacéuticamente aceptable.

[53] La composición de [52], que es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

[54] La composición de [52] o [53], que es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, o cáncer de hígado.

[55] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51] en la manufactura de un medicamento.

[56] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51] en la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

5 [57] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51] en la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

10 [58] Un método para tratar a un individuo que tenga cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51].

 [59] Un método para tratar a un individuo que tenga
15 cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51].

20 [60] Un kit para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende al menos la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51], e instrucciones de uso.

 [61] Un kit para su uso en el tratamiento y/o
25 prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células

no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado, que comprende al menos la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [50] o el inmunoconjugado de [51], e instrucciones de uso.

[62] Un método para detectar la presencia de CLDN6
5 en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra biológica con la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [41].

[63] El método de [62], en donde la muestra biológica se pone en contacto con la molécula de unión a antígeno en
10 condiciones permisivas para la unión de la molécula de unión a antígeno a CLDN6, y se detecta si se forma un complejo entre la molécula de unión a antígeno y CLDN6.

[64] Un método para diagnosticar si un sujeto tiene cáncer o no, que comprende poner en contacto una muestra
15 biológica del sujeto con la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [41].

[65] El método de [64], en donde la muestra biológica se pone en contacto con la molécula de unión a antígeno en condiciones permisivas para la unión de la molécula de unión a
20 antígeno a CLDN6, y se detecta si se forma un complejo entre la molécula de unión a antígeno y CLDN6.

[66] El método de [64] o [65], en donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

25 [67] Ácido nucleico aislado que codifica para la

molécula de unión a antígeno de cualquiera de [34] a [41].

[68] Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico de [67].

[69] Un método para producir una molécula de unión a antígeno que comprende cultivar la célula hospedera de [68] de tal manera que se produzca la molécula de unión a antígeno.

[70] El método de [69], que comprende además recuperar la molécula de unión a antígeno del cultivo de la célula hospedera.

10 Además, la presente invención también proporciona lo siguiente:

[71] Una molécula de unión a antígeno que comprende:
un primer sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia CLDN6, y

15 un segundo sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia el complejo receptor de células T,
en donde el primer sitio de unión a antígeno está formado por

(a) una región variable de la cadena pesada que
20 comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; y

25 (a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de

cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85;

y

5 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

 (b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121,
10 respectivamente; y

 (b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54, 82, 86, 88 y 58.

15 [72] La molécula de unión a antígeno de [71], en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera que forman el primer sitio de unión a antígeno comprenden además estructuras de ratón, conejo, humanizadas o humanas.

20 [73] Una molécula de unión a antígeno que comprende: un primer sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia CLDN6, y

 un segundo sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia el complejo receptor de células T,

25 en donde el primer sitio de unión a antígeno

comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1, 33, 84, 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83 y 57 y una región variable de la cadena
5 ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86, 88, 92, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 54, 82 y 58.

[74] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [73], en donde el primer sitio de unión a antígeno
10 tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana.

[75] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [74], en donde el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NO: 125 o 126.

15 [76] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [75], en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN9 humana.

[77] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [76], en donde el primer sitio de unión a antígeno
20 no se une sustancialmente a CLDN4 humana.

[78] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [77], en donde el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN3 humana.

[79] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
25 de [71] a [78], en donde el primer sitio de unión a antígeno

no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en SEC ID NO: 134.

[80] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [73], en donde el primer sitio de unión a antígeno
5 está incluido en un Fv de cadena sencilla (scFv), Fv o Fab.

[81] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [80], en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CD3.

[82] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
10 de [71] a [80], en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia la cadena épsilon de CD3.

[83] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [80], en donde el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia el receptor de células T.

[84] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
15 de [71] a [82], en donde el segundo sitio de unión a antígeno está formado por una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de SEC ID NOS: 122, 123 y 124, respectivamente; y una
20 región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOS: 114, 115 y 116, respectivamente.

[85] La molécula de unión a antígeno de [84], en donde la región variable de la cadena pesada y la región
25 variable de la cadena ligera comprenden estructuras de ratón,

conejo, humanizadas o humanas.

[86] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [82], en donde el segundo sitio de unión a antígeno está formado por una región variable de la cadena pesada que
5 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 60 y 70 y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 61 y 71.

[87] La molécula de unión a antígeno de cualquiera
10 de [71] a [86], en donde el segundo sitio de unión a antígeno está incluido en un Fv de cadena sencilla (scFv), Fv o Fab.

[88] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [87], en donde la molécula de unión a antígeno comprende además una región Fc de anticuerpo.

15 [89] La molécula de unión a antígeno de [88], en donde la región Fc es una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc gamma.

[90] La molécula de unión a antígeno de [88] o [89], en donde la región Fc es una región Fc con al menos una mutación
20 de aminoácido en cualquiera de la región Fc que constituye los aminoácidos de SEC ID NOs: 143 a 146 (IgG1 a IgG4).

[91] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [88] a [90], en donde la región Fc es una región Fc con mutación de al menos un aminoácido seleccionado de las
25 siguientes posiciones de aminoácidos especificadas por

numeración EU:

posición 220, posición 226, posición 229, posición 231, posición 232, posición 233, posición 234, posición 235, posición 236, posición 237, posición 238, posición 239,
 5 posición 240, posición 264, posición 265, posición 266, posición 267, posición 269, posición 270, posición 295, posición 296, posición 297, posición 298, posición 299, posición 300, posición 325, posición 327, posición 328, posición 329, posición 330, posición 331 y posición 332.

10 [92] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [88] a [91], en donde la región Fc es una región Fc que comprende al menos un aminoácido seleccionado de los siguientes aminoácidos especificados por numeración EU:

Arg en la posición de aminoácido 234, Ala o Arg en
 15 la posición de aminoácido 235, Lys en la posición de aminoácido 239 y Ala en la posición de aminoácido 297.

[93] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [88] a [92], en donde

el dominio variable de la cadena pesada que forma el
 20 primer sitio de unión a antígeno está unido a la región Fc a través de un primer dominio CH1, el dominio variable de la cadena ligera que forma el primer sitio de unión a antígeno está unido a un primer dominio CL; y

el dominio variable de la cadena pesada que forma el
 25 segundo sitio de unión a antígeno está unido a la región Fc a

través de un segundo dominio CH1, el dominio variable de la cadena ligera que forma el segundo sitio de unión a antígeno está unido a un segundo dominio CL.

[94] La molécula de unión a antígeno de [93], en
5 donde las cargas eléctricas de los dominios CH1 y CL se controlan de tal manera que la región variable de la cadena pesada que forma el primer dominio de unión a antígeno se ensamble con la región variable de la cadena ligera que forma el primer dominio de unión a antígeno, y/o la región variable
10 de la cadena pesada que forma el segundo dominio de unión a antígeno se ensamble con la región variable de la cadena ligera que forma el segundo dominio de unión a antígeno.

[95] La molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [94], en donde la molécula de unión a antígeno tiene
15 actividad citotóxica.

[96] La molécula de unión a antígeno de [95], en donde la actividad citotóxica es actividad citotóxica dependiente de células T.

[97] Un polinucleótido aislado que codifica para la
20 molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96].

[98] Una célula hospedera que comprende el polinucleótido de [97].

[99] Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedera de [98] de tal manera
25 que se produzca la molécula de unión a antígeno.

[100] El método de [99], que comprende además recuperar la molécula de unión a antígeno del cultivo de la célula hospedera.

[101] Una composición farmacéutica que comprende la
5 molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96] y un portador farmacéuticamente aceptable.

[102] La composición farmacéutica de [101], que induce citotoxicidad dependiente de células T.

[103] La composición de [101] o [102], que es una
10 composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

[104] La composición de cualquiera de [101] a [103], que es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de
15 células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

[105] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96] en la manufactura de un medicamento.

[106] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96] en la manufactura de un medicamento
20 para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

[107] Uso de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96] en la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de
25 hígado.

[108] Un método para tratar a un individuo que tenga cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96].

5 [109] Un método para tratar a un individuo que tenga cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96].

10 [110] Un kit para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende al menos la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96], e instrucciones de uso.

[111] Un kit para su uso en el tratamiento y/o
15 prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado, que comprende al menos la molécula de unión a antígeno de cualquiera de [71] a [96] e instrucciones de uso.

Efectos ventajosos de la invención

20 La presente invención proporciona moléculas multiespecíficas de unión a antígeno que permiten el tratamiento del cáncer al tener células T cercanas a las células que expresan CLDN6 y usando la citotoxicidad de las células T contra las células cancerosas que expresan CLDN6,
25 métodos para producir moléculas de unión a antígeno

multiespecíficas, y composiciones farmacéuticas que contienen tal molécula de unión a antígeno multiespecífica como ingrediente activo para inducir citotoxicidad celular. Las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas de la presente
5 invención tienen una fuerte actividad antitumoral, inducen citotoxicidad celular y pueden dirigirse y dañar las células que expresan CLDN6, permitiendo así el tratamiento y la prevención de varios cánceres. Además, las moléculas de unión a antígeno comprenden secuencias específicas que también tienen
10 una especificidad superior hacia CLDN6, una semivida prolongada en sangre, así como propiedades de seguridad, estabilidad y capacidad de manufactura mejoradas.

La presente invención también proporciona moléculas de unión a antígeno que muestran una especificidad superior
15 hacia CLDN6, que permiten la detección precisa de la presencia de CLDN6 en la muestra biológica y el diagnóstico de varios cánceres. También se habilita el tratamiento del cáncer dirigiéndose a las células que expresan CLDN6.

Breve Descripción de las Figuras

20 Figuras 1A a 1C - Actividad de activación de linfocitos T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01, CDA0013/TR01 y 6PHU3/TR01). La actividad de activación de células T de cada anticuerpo se examinó en presencia de hCLDN6/BaF (figura 1A), hCLDN9/BaF (figura 1B) y
25 hCLDN6 (Q156L)/BaF (figura 1C). El eje vertical indica el

nivel de luminiscencia del pocillo que contiene anticuerpo en comparación con el del pocillo sin anticuerpo y el eje horizontal indica la concentración de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3.

5 Figura 2A - Especificidad de unión de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01, CDA0013/TR01 y 6PHU3/TR01) a proteínas de la familia Claudina humana y de ratón. La actividad de unión relativa de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 se examinó mediante
10 un citómetro de flujo en una concentración de 10 µg/ml. El eje vertical indica los valores de MFI de un anticuerpo que se une a los transfectantes FreeStyle™ 293-F, que expresan de forma transitoria CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 humanas o de ratón. Se usó KLH/TR01 como control negativo. El anticuerpo
15 CLDN6 humana disponible comercialmente (MAB3656), el anticuerpo CLDN3 humana (MAB4620) y el anticuerpo CLDN4 humana (MAB4219) se probaron como control.

Figura 2B - Continuación de la figura 2A.

Figuras 3A y 3B - Eficacia antitumoral *in vivo* de
20 anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01). La figura 3A muestra el cambio de volumen tumoral del modelo de inyección de células T HuH-7, y la figura 3B muestra el cambio de volumen tumoral del modelo de inyección de células T OV-90. En este estudio, a cada grupo
25 (n = 5) se le administraron 5 mg/kg de anticuerpos o vehículo

por vía intravenosa el día 14 después de la inoculación del tumor.

Figuras 4A y 4B - El cambio de peso corporal de los ratones tratados con 5 mg/kg de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01) como se describe en las figuras 3A-3B. El cambio de peso corporal de HuH- 7 que lleva el modelo de inyección de células T (figura 4A) y el modelo de inyección de células T que lleva OV-90 (figura 4B) se muestran respectivamente. El eje vertical indica el peso corporal y el eje horizontal indica los días posteriores a la inoculación del tumor.

Figura 5 - Niveles plasmáticos de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA en el modelo de inyección de células T OV-90 después de la administración de 5 mg/kg de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01) o vehículo como se describe en las figuras 3A-3B. El eje vertical indica la concentración de ALT (alanina aminotransferasa), ALP (fosfatasa alcalina), GGT (gamma-glutamil transpeptidasa), GLDH (glutamato deshidrogenasa), TBIL (bilirrubina total) y TBA (ácido biliar total), respectivamente.

Figura 6 - El cambio temporal de la concentración de anticuerpo en el ratón tratado con 5 mg/kg de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01) como se describe en las figuras 3A-3B.

Concentración plasmática de anticuerpo en Se muestran respectivamente el modelo de inyección de células T HuH-7 (superior) y el modelo de inyección de células T OV-90 (inferior). El eje vertical indica la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/mL}$) en el plasma del ratón y el eje horizontal indica los días después del tratamiento.

Figura 7 - Eficacia antitumoral *in vivo* y cambio de peso corporal de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en el modelo de inyección de células T OVCAR-3. Los ratones se trataron con 5 mg/kg de AE3-20/TR01, CDA0013/TR01 o vehículo por vía intravenosa el día 29 después del trasplante de tumor. El volumen del tumor (superior) y el peso corporal (inferior) se examinaron después del tratamiento.

Figura 8 - Niveles plasmáticos de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA después del tratamiento de 5 mg/kg de CDA0013/TR01 en el modelo de inyección de células T OVCAR-3 como se describe en la figura 7. El eje vertical indica la concentración de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA respectivamente, después de la administración de CDA0013/TR01 o sin tratamiento.

Figura 9 - El cambio temporal de la concentración de AE3-20/TR01 y CDA0013/TR01 en el modelo de inyección de células T OVCAR-3 como se describe en la figura 7. El eje vertical indica la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/mL}$) en el plasma de ratón y el eje horizontal indica días después del tratamiento.

Figura 10 - Actividades de unión de varios anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 a hCLDN6/BaF. El eje vertical indica los valores de MFI del anticuerpo frente a hCLDN6/BaF, de manera lineal, tomados como actividad de unión.

5 Figura 11 - Actividad de activación de células T de varios anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF. El eje horizontal indica el nivel de luminiscencia del pocillo que contiene el anticuerpo en comparación con el del pocillo sin
10 anticuerpo. Se usó KLH/TR01 como control negativo. Las barras se muestran en el siguiente orden desde la parte inferior: CLDN6, CLDN3, CLDN4 y CLDN9.

Figura 12 - Continuación de la figura 11.

Figura 13 - Actividad de activación de células T de
15 varios anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF. El eje horizontal indica el nivel de luminiscencia del pocillo que contiene el anticuerpo en comparación con el del pocillo sin anticuerpo. No se ensayaron 1 nM y 0.1 nM de KLH/TR01 en
20 presencia de hCLDN6/BaF. Se usó KLH/TR01 como control negativo. Las barras se muestran en el siguiente orden desde la parte inferior: CLDN6 (concentración de anticuerpos 10 nM), CLDN6 (concentración de anticuerpos 1 nM), CLDN6 (concentración de anticuerpos 0.1 nM), CLDN3 (concentración de anticuerpos 10
25 nM), CLDN4 (concentración de anticuerpos 10 nM)) y CLDN9

(concentración de anticuerpo 10 nM).

Figura 14 - Actividad de activación de células T de
 varios anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia
 de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF. El eje
 5 horizontal indica el nivel de luminiscencia del pocillo que
 contiene el anticuerpo en comparación con el del pocillo sin
 anticuerpo. No se ensayaron 1 nM y 0.1 nM de KLH/TR01 en
 presencia de hCLDN6/BaF. Se usó KLH/TR01 como control
 negativo. Las barras se muestran en el siguiente orden desde
 10 la parte inferior: CLDN6 (concentración de anticuerpos 10 nM),
 CLDN6 (concentración de anticuerpos 1 nM), CLDN6 (concentración
 de anticuerpos 0.1 nM), CLDN3 (concentración de anticuerpos 10
 nM), CLDN4 (concentración de anticuerpos 10 nM)) y CLDN9
 (concentración de anticuerpo 10 nM).

Figura 15 - Actividad de activación de células T de
 varios anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia
 de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF. El eje
 horizontal indica el nivel de luminiscencia del pocillo que
 contiene el anticuerpo en comparación con el del pocillo sin
 20 anticuerpo. No se ensayaron 1 nM y 0.1 nM de KLH/TR01 en
 presencia de hCLDN6/BaF. Se usó KLH/TR01 como control
 negativo. Las barras se muestran en el siguiente orden desde
 la parte inferior: CLDN6 (concentración de anticuerpos 10 nM),
 CLDN6 (concentración de anticuerpos 1 nM), CLDN6 (concentración
 25 de anticuerpos 0.1 nM), CLDN3 (concentración de anticuerpos 10

nM), CLDN4 (concentración de anticuerpos 10 nM)) y CLDN9 (concentración de anticuerpo 10 nM).

Figuras 16A y 16B - Heterogeneidad de carga de 65H0671Q39E-SG1189v14k/54L0571Q38K-SK1018//TR01H(Q39K) -

5 SG1191v14h/TR01L(Q38E)-SK1017 (figura 16A) y 65H0671Q39E-SG1189v14k/54L0571QVK14h(Q1039)SK1017 (figura 16B). La heterogeneidad de carga y los valores de pI se evaluaron usando Maurice (ProteinSimple) con absorbancia UV a 280 nm. Se usó el software asociado Compass para iCE (2.0.10) para el análisis
10 de datos.

Figura 17 - Eficacia antitumoral *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 AE3-20/TR01 y CS2201 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única de cada anticuerpo
15 biespecífico anti-CLDN6/CD3 a 0.1 mg/kg el día 14 después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor (superior) y el peso corporal (inferior) se muestran respectivamente.

Figura 18 - Eficacia antitumoral *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 AE3-20/TR01 y CS2201 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única de cada anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 a 5 mg/kg el día 15 después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor
20 (superior) y el peso corporal (inferior) se muestran
25

respectivamente.

Figura 19 - Niveles plasmáticos de ALT, GLDH, TBA, ALP y TBIL después del tratamiento de 5 mg/kg de AE3-20/TR01 o CS2201 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en las figuras 17 y 18. El eje vertical indica la concentración de ALT, GLDH, TBA, ALP y TBIL después de la administración de AE3-20/TR01, CS2201 y el vehículo.

Figura 20 - El cambio temporal de la concentración de AE3-20/TR01 y CS2201 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en las figuras 17 y 18. El eje vertical indica la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/mL}$) en el plasma del ratón y el eje horizontal indica los días después del tratamiento.

Figura 21A - Eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo biespecífico CS2425 anti-CLDN6/CD3 en modelo de inyección de células T OV-90. Se administró una dosis única de 0.1 mg/kg de CS2425 por vía intravenosa el día 15 después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor (superior) y los cambios de peso corporal (inferior) se muestran respectivamente.

Figura 21B - Eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo biespecífico CS2425 anti-CLDN6/CD3 en modelo de inyección de células T OV-90. Se administró una dosis única de 5 mg/kg de CS2425 por vía intravenosa el día 15 después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor

(superior) y los cambios de peso corporal (inferior) se muestran respectivamente.

Figura 22 - Niveles plasmáticos de ALT, GGT, TBA, ALP y TBIL después del tratamiento de CS2425 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en las figuras 21A y 21B. El eje vertical indica la concentración de ALT, GGT, TBA, ALP y TBIL después de la administración de 0.1 mg/kg y 5 mg/kg de CS2425 o vehículo.

Figura 23 - El cambio temporal de la concentración de CS2425 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en las figuras 21A y 21B. El eje vertical indica la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/mL}$) en el plasma del ratón y el eje horizontal indica los días después del tratamiento.

Figura 24 - Una gráfica que muestra el valor máximo de la proporción de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 en PBMCs CD8-CD25^{low} cultivadas durante 67 horas en presencia de cada una de las sustancias de prueba, incluido el control negativo y el control positivo. Los datos muestran los valores máximos de las proporciones de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 para los respectivos donantes de los que se derivan las PBMCs usadas. Ningún antígeno muestra el resultado del control del estudio cuando el cultivo se llevó a cabo en ausencia de una sustancia de prueba. La línea de puntos muestra un umbral positivo.

Figura 25 - Una gráfica que muestra mapas de calor

del número de péptidos por posición de aminoácido identificados para una parte de la cadena ligera de CS2425 por MAPP. El número de péptidos identificados por posición de aminoácido para la región se muestra en mapas de calor en los que los colores de las células representan el número de péptidos identificados (ver clave). Los complejos péptido-MHC II se obtuvieron a partir de DCs pulsadas con CS2425 diferenciadas de monocitos.

Figura 26 - Una gráfica que muestra el valor máximo de la proporción de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 en PBMCs CD8-CD25^{low} cultivadas durante 67 horas en presencia de cada una de las sustancias de prueba, incluido el control negativo y el control positivo. Los datos muestran los valores máximos de las proporciones de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 para los respectivos donantes de los que se derivan las PBMCs usadas. Ningún antígeno muestra el resultado del control del estudio cuando el cultivo se llevó a cabo en ausencia de una sustancia de prueba. La línea de puntos muestra un umbral positivo.

Figura 27 - Eficacia antitumoral *in vivo* en ratones tratados con los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 CS2201, CS2425, CS2884, CS2885 y CS2886 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única de 5 mg/kg de cada anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 el día 15 después de la inoculación

del tumor. El volumen del tumor (superior) y el peso corporal (inferior) se examinaron en ratones después de la administración única de 5 mg/kg de cada anticuerpo.

Figura 28 - Nivel plasmático de marcadores de daño hepático en ratones tratados con los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 CS2201, CS2425, CS2884, CS2885 y CS2886 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se muestra en la figura 27. Se evaluaron los niveles en plasma de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA en ratones después del tratamiento de cada uno de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3. El eje vertical indica la concentración de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA en plasma de ratón después de la administración de 5 mg/kg de cada vehículo o anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3.

Figura 29 - Eficacia antitumoral *in vivo* en ratones tratados con los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 CS2201, CS2425, CS2958, CS2959, CS2960 y CS2961 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única de 5 mg/kg de cada anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 el día 15 después de la inoculación del tumor. El volumen del tumor (superior) y el peso corporal (inferior) se examinaron en ratones después de la administración única de 5 mg/kg de cada anticuerpo.

Figura 30 - Nivel plasmático de marcadores de lesión hepática en ratones tratados con los anticuerpos biespecíficos

anti-CLDN6/CD3 CS2201, CS2425, CS2958, CS2959, CS2960 y CS2961 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se muestra en la figura 29. Se evaluaron los niveles en plasma de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA en ratones después del tratamiento de cada uno de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3. El eje vertical indica la concentración de ALT, GGT, TBIL, ALP, GLDH y TBA en plasma de ratón después de la administración de 5 mg/kg de cada vehículo o anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3.

Figura 31 - El cambio temporal de la concentración de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 CS2201, CS2425, CS2958, CS2959, CS2960 y CS2961 en el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en la figura 29. El eje vertical indica la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/mL}$) en el plasma del ratón y el eje horizontal indica días después del tratamiento.

Figura 32 - Actividad de activación de células T de diversas concentraciones de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, CS2201, 6PHU3/TR01, CS2425 y CS2961) en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF, hCLDN9/BaF o hCLDN6 (Q156L)/BaF determinado por bioensayo de activación de células T usando células Jurkat GloResponse™ NFAT-luc2. El eje vertical indica el nivel de luminiscencia del pocillo que contiene anticuerpo en comparación con el pocillo sin anticuerpo. Se usó KLH/TR01 como control negativo.

Figura 33 - Actividad de activación de células T de diversas concentraciones de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (CS2201, CS2961, CS3346, CS3347 y CS3348) en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinada por T Cell Bioensayo de activación usando células Jurkat GloResponse™ NFAT-luc2. El eje vertical indica el nivel de luminiscencia del pocillo que contiene anticuerpo en comparación con el pocillo sin anticuerpo. Se usó KLH/TR01 como control negativo.

Figura 34 - Citotoxicidad celular dependiente de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, CS2201, 6PHU3/TR01, CS2425, CS2961, CS3346, CS3347 y CS3348) contra la línea celular de cáncer de ovario OVCAR3 que expresa CLDN6 determinada por ensayo LDH. El eje vertical indica el porcentaje de lisis celular y el eje horizontal indica la concentración de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3. Se usó KLH/TR01 como control negativo.

Figura 35A - Actividad de unión de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (CS2201, CS2961, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01) a proteínas de la familia CLDN humana (CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9). La actividad de unión de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 a los transfectantes BaF3 (hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF y hCLDN9/BaF) se examinó mediante citómetro de flujo en una concentración de 15 µg/ml y se representó como histograma. Se usó KLH/TR01 como control

negativo. La especificidad de CS2961 para CLDN6 humana fue más alta entre los anticuerpos probados.

Figura 35B - Continuación de la figura 35A

Figura 36 - Formación de especies de HMW de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 después del almacenamiento a 40 grados C. El eje vertical indica el porcentaje de especies de HMW en el área de pico total de cada muestra.

Figura 37 - Eficacia antitumoral dependiente de la dosis *in vivo* del anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única que variaba de 0.001 a 5 mg/kg de AE3-20/TR01 14 días después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor (superior) y los cambios de peso corporal (inferior) se muestran respectivamente.

Figura 38 - Eficacia antitumoral dependiente de la dosis *in vivo* del anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 en el modelo de inyección de células T OV-90. Se administró por vía intravenosa una dosis única que variaba de 0.0016 a 5 mg/kg de CS3348 15 días después de la inoculación del tumor. Los cambios de volumen del tumor (superior) y los cambios de peso corporal (inferior) se muestran respectivamente.

Figura 39 - Alineación de secuencias de aminoácidos de CLDN9 humana y CLDN6 humana. CLDN9 humana y CLDN6 humana comprenden casi la misma secuencia en el dominio extracelular

1, excepto el residuo N-terminal (Met/Leu en la posición 29). Dos aminoácidos en el dominio extracelular 2 son diferentes en CLDN9 humana y CLDN6 humana (Arg/Leu en la posición 145 y Gln/Leu en la posición 156).

5 Figura 40 - Eficacia antitumoral del anticuerpo biespecífico CS3348 anti-CLDN6/CD3 en el modelo de inyección de células T con OVCAR-3 (TK220001)

 Figura 41 - Eficacia antitumoral del anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 CS3348 en el modelo de inyección
10 de linfocitos T con NCI-H1435 (TK219005)

 Figura 42 - Eficacia antitumoral del anticuerpo biespecífico CS3348 anti-CLDN6/CD3 en el modelo de inyección de linfocitos T con NUGC-3 (TK220003)

Descripción Detallada de la Invención

15 Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento se entienden generalmente bien y se emplean comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente usadas descritas en
20 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); las series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J.
25 MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and

Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Las definiciones y la descripción detallada a

continuación se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención ilustrada en este documento.

Definiciones

Aminoácidos

5 En este documento, los aminoácidos se describen mediante códigos de una o tres letras o ambos, por ejemplo, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I o Val/V.

10 Alteración de aminoácidos

 Para la alteración de aminoácidos (también descrita como "sustitución de aminoácidos" en esta descripción) en la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión a antígeno, métodos conocidos tales como métodos de mutagénesis dirigida
15 al sitio (Kunkel et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492)) y se puede emplear apropiadamente la PCR de extensión por superposición. Además, también se pueden emplear varios métodos conocidos como métodos de alteración de aminoácidos para la sustitución de aminoácidos no naturales (Annu Rev.
20 Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249; y Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100 (11), 6353-6357). Por ejemplo, es adecuado usar un sistema de traducción libre de células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene un ARNt que tiene un aminoácido no natural unido a un ARNt supresor ámbar
25 complementario de uno de los codones de terminación, el codón

UAG. (codón ámbar).

En la presente descripción, el significado del término "y/o" cuando se describe el sitio de alteración de aminoácidos incluye todas las combinaciones en las que "y" y
5 "o" se combinan de forma adecuada. Específicamente, por ejemplo, "los aminoácidos en las posiciones 33, 55 y/o 96 están sustituidos" incluye la siguiente variación de alteraciones de aminoácidos: aminoácido (s) en (a) posición 33, (b) posición 55, (c) posición 96, (d) posiciones 33 y 55, (e) posiciones 33
10 y 96, (f) posiciones 55 y 96, y (g) posiciones 33, 55 y 96.

Además, en el presente documento, tal como una expresión que muestra la alteración de los aminoácidos, se puede usar apropiadamente una expresión que muestra antes y después de un número que indica una posición específica,
15 códigos de una o tres letras para los aminoácidos antes y después de la alteración, respectivamente. Por ejemplo, la alteración N100bL o Asn100bLeu usada cuando se sustituye un aminoácido contenido en una región variable de anticuerpo indica la sustitución de Asn en la posición 100b (de acuerdo
20 con la numeración de Kabat) por Leu. Es decir, el número muestra la posición de los aminoácidos de acuerdo con la numeración de Kabat, el código de aminoácidos de una o tres letras escrito antes del número muestra el aminoácido antes de la sustitución y el código de aminoácido de una o tres letras
25 escrito después del número muestra el aminoácido después de la

sustitución. De manera similar, la alteración P238D o Pro238Asp usada cuando se sustituye un aminoácido de la región Fc contenida en una región constante de anticuerpo indica la sustitución de Pro en la posición 238 (de acuerdo con la numeración EU) por Asp. Es decir, el número muestra la posición de los aminoácidos de acuerdo con la numeración EU, el código de aminoácidos de una o tres letras escrito antes del número muestra el aminoácido antes de la sustitución y el código de aminoácido de una o tres letras escrito después del número muestra el aminoácido después de la sustitución.

Molécula de unión a antígeno

El término "molécula de unión a antígeno", tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier molécula que comprende un sitio de unión a antígeno o cualquier molécula que tiene actividad de unión a un antígeno, y puede además referirse a moléculas como un péptido o proteína que tiene una longitud de aproximadamente cinco aminoácidos o más. El péptido y la proteína no se limitan a los derivados de un organismo vivo y, por ejemplo, pueden ser un polipéptido producido a partir de una secuencia diseñada artificialmente. También pueden ser cualquier polipéptido natural, polipéptido sintético, polipéptido recombinante y similares. Las moléculas de armazón que comprenden una estructura conformacional estable conocida tal como un barril alfa/beta como armazón, y en donde parte de la molécula se convierte en un sitio de unión a

antígeno, también es una modalidad de la molécula de unión a antígeno descrita en el presente documento.

Claudina-6 (CLDN6) y otras proteínas de la familia Claudina

5 El término "CLDN6", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier Claudina-6 nativa de cualquier fuente de vertebrados, incluidos mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La
10 secuencia de aminoácidos de CLDN6 humana (hCLDN6) se muestra en SEC ID NO: 125 o 126, y la secuencia de aminoácidos de CLDN6 de ratón (mCLDN6) se muestra en SEC ID NO: 130.

Hay muchas otras proteínas dentro de la familia Claudina además de CLDN6, tales como CLDN3, CLDN4 y CLDN9. Las
15 secuencias de aminoácidos de CLDN3 humana (hCLDN3), CLDN4 humana (hCLDN4) y CLDN9 humana (hCLDN9) se muestran en SEC ID NOs: 128, 129 y 127, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de CLDN3 de ratón (mCLDN3), CLDN4 de ratón (mCLDN4) y CLDN9 de ratón (mCLDN9) se muestran en SEC ID NOs: 132, 133
20 y 131, respectivamente.

Actividad de unión hacia CLDN6

La actividad de unión hacia CLDN6 descrita en este documento se refiere a una actividad de unión específica hacia la proteína CLDN6 descrita en este documento, o la totalidad o
25 una parte de un péptido parcial de la proteína CLDN6.

En determinadas modalidades, la actividad de unión hacia CLDN6 es la actividad de unión hacia el primer dominio extracelular de CLDN6 (aminoácidos 29-81 de SEC ID NO: 125 o 126) o el segundo dominio extracelular de CLDN6 (aminoácidos 138-159 de SEC ID NO: 125 o 126). En determinadas modalidades, la actividad de unión hacia CLDN6 es la actividad de unión hacia CLDN6 humana expresada en la superficie de células eucariotas. En determinadas modalidades, la actividad de unión hacia CLDN6 es la actividad de unión hacia la proteína CLDN6 expresada en la superficie de las células cancerosas.

Actividad de unión al complejo receptor de células T

La actividad de unión hacia el complejo receptor de células T como se usa en este documento se refiere a la actividad de unión hacia la totalidad o una parte de un péptido parcial de un complejo receptor de células T. El complejo del receptor de células T puede ser un receptor de células T en sí mismo, o una molécula adaptadora que constituya un complejo receptor de células T junto con un receptor de la célula T. El CD3 es adecuado como molécula adaptadora.

La actividad de unión hacia el receptor de células T como se usa en este documento se refiere a la actividad de unión hacia la totalidad o una parte de un péptido parcial de un receptor de células T. La porción de un receptor de células T puede ser una región variable del receptor de células T o una región constante del receptor de células T; sin embargo,

se prefiere un epítopo presente en la región constante. Ejemplos de la secuencia de la región constante incluyen la cadena alfa del receptor de células T de RefSeq No. reg. CAA26636.1 (SEC ID NO: 135), la cadena beta del receptor de
 5 células T de RefSeq No. reg. C25777 (SEC ID NO: 136), la cadena del receptor de células T gamma 1 de RefSeq No. reg. A26659 (SEC ID NO: 137), la cadena del receptor de células T gamma 2 de RefSeq No. reg. AAB63312.1 (SEC ID NO: 138), y la cadena delta del receptor de células T de RefSeq No. reg. AAA61033.1
 10 (SEC ID NO: 139).

La actividad de unión hacia CD3 como se usa en este documento se refiere a la actividad de unión hacia la totalidad o una porción de un péptido parcial de CD3. La porción de CD3 puede ser cualquier epítopo existente en la secuencia de cadena
 15 gamma, cadena delta o cadena épsilon que constituya la CD3 humana. Con respecto a la estructura de la cadena gamma, cadena delta o cadena épsilon que constituye CD3, sus secuencias de polinucleótidos se describen en RefSeq Nos. reg. NM_000073.2, NM_000732.4 y NM_000733.3, y sus secuencias de
 20 polipéptidos se muestran en SEC ID NOS: 140 (NP_000064.1), 141 (NP_000723.1) y 142 (NP_000724.1), en donde los números de registro de RefSeq se muestran entre paréntesis.

Afinidad

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total
 25 de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión

de una molécula (por ejemplo, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, molécula de unión a antígeno y antígeno, o anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (K_d). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento. A continuación se describen modalidades ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión.

Métodos para determinar la afinidad

En ciertas modalidades, la molécula de unión a antígeno o el anticuerpo proporcionado en este documento tiene una constante de disociación (K_d) de 1 μ M o menos, 120 nM o menos, 100 nM o menos, 80 nM o menos, 70 nM o menos, 50 nM o menos, 40 nM o menos, 30 nM o menos, 20 nM o menos, 10 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, 0.1 nM o menos, 0.01 nM o menos, o 0.001 nM o menos (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, 10^{-8} M a 10^{-13} M, 10^{-9} M a 10^{-13} M) para su antígeno. En ciertas modalidades, el valor de K_d de la molécula de unión de anticuerpo/antígeno para CLDN6 se encuentra dentro del intervalo de 1-40, 1-50, 1-70, 1-80, 30-50, 30-70, 30-80, 40-

70, 40-80 o 60-80 nM.

En una modalidad, Kd se mide mediante un ensayo de unión a antígeno (RIA) radiomarcado. En una modalidad, se lleva a cabo un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de
5 interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno sin marcar, y luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta
10 con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de múltiples pocillos MICROTITER (marca registrada) (Thermo Scientific) se recubren durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de
15 captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y posteriormente bloqueado con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 grados C). En una placa no adsorbente (Nunc # 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno [^{125}I]
20 con diluciones seriadas de un Fab de interés (por ejemplo, se acuerdo con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)). A continuación, se incuba el Fab de interés durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período
25 más largo (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para asegurar

que se alcance el equilibrio. Luego, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, se retira la solución y se lava la placa ocho veces con
5 polisorbato 20 al 0.1% (TWEEN-20 (marca registrada)) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al
10 20% de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra modalidad, K_d se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial BIACORE (marca registrada). Por ejemplo, un ensayo que usa un BIACORE (marca
15 registrada) -2000 o un BIACORE (marca registrada) -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 25 grados C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En una modalidad, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc.) se activan con
20 clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (~0.2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr
25 aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína

acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0.78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) al 0.05% (PBST) a 25 grados C a un caudal de aproximadamente 25 μ l/min. Las tasas de asociación (k_{asoc}) y las tasas de disociación (k_{disoc}) se calculan usando un modelo de enlace de Langmuir simple uno a uno (BIAcore (marca registrada) Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{disoc}/k_{asoc} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293: 865 - 881 (1999). Si la tasa de activación supera los 10^6 M⁻¹ s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, entonces la tasa de activación se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 grados C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con parada de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCOTM de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

De acuerdo con los métodos para medir la afinidad de la molécula de unión a antígeno o del anticuerpo descritos anteriormente, los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la medición de la afinidad por otras moléculas de unión a antígeno o anticuerpos, hacia varios tipos de antígenos.

Anticuerpo

El término "anticuerpo" en este documento se usa en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten el antígeno deseado. actividad de unión.

Clase de anticuerpo

La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estos pueden dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente.

A menos que se indique lo contrario, los residuos de aminoácido en la región constante de la cadena ligera se enumeran en este documento de acuerdo con Kabat *et al.*, y la

numeración de los residuos de aminoácido en la región constante de la cadena pesada se lleva a cabo de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como descrito en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1991.

Marco

"Marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1 (L1)-FR2-H2 (L2)-FR3-H3 (L3)-FR4.

Marco de consenso humano

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácido que se encuentran más comúnmente en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una modalidad, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, arriba. En una modalidad, para el VH,

el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, arriba.

HVR

El término "región hipervariable" o "HVR" como se usa en este documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia ("regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs") y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos con el antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVRs: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Ejemplos de HVRs en este documento incluyen:

(a) bucles hipervariables que se producen en los residuos de aminoácido 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987));

(b) CDRs que ocurren en los residuos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991));

(c) contactos de antígeno que ocurren en los residuos de aminoácido 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); y

(d) combinaciones de (a), (b) y/o (c), incluidos los residuos de aminoácido HVR 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3) y 94-102 (H3).

5 A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se enumeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, arriba.

10 HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 también se mencionan como "H-CDR1", "H-CDR2", "H-CDR3", "L-CDR1", "L-CDR2" y "L-CDR3", respectivamente.

Región variable

15 El término "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena ligera o pesada de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco conservadas (FRs) y tres regiones hipervariables

20 (HVRs). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL

25 de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una

biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, J. Immunol. 150: 880 - 887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991).

5 Anticuerpo quimérico

El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en donde una parte de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente. De manera similar, el término "dominio variable de anticuerpo quimérico" se refiere a una región variable de anticuerpo en donde una porción de la región variable de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de región variable de la cadena pesada y/o ligera se deriva de una fuente o especie diferente.

Anticuerpo humanizado

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVRs no humanas y residuos de aminoácido de FRs humanas. En ciertas modalidades, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las HVRs (por ejemplo, CDRs) corresponden a los de un anticuerpo no humano, y todos o sustancialmente todas las FRs

corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, 5 un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha humanizado. Una "región variable de anticuerpo humanizado" se refiere a la región variable de un anticuerpo humanizado.

Anticuerpo humano

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia 10 de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por una célula humana o humana o derivado de una fuente no humana usando repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un 15 anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Una "región variable de anticuerpo humano" se refiere a la región variable de un anticuerpo humano.

Polinucleótido (ácido nucleico)

20 "Polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas y/o sus 25 análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse a un

polímero mediante ADN o ARN polimerasa o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Una secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por

5 componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede comprender modificaciones hechas después de la síntesis, tal como la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo,

10 modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contienen restos

15 colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales

20 oxidantes, etc.), los que contienen alquilantes, los que tienen enlaces modificados (por ejemplo, alfa anoméricos ácidos nucleicos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares puede ser reemplazado,

25 por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos

por grupos protectores estándar, o activados para preparar
 enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden
 conjugarse a soportes sólidos o semisólidos. El OH terminal
 5' y 3' puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos
 5 de grupos protectores orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono.
 También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores
 estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas
 análogas de azúcares ribosa o desoxirribosa que son
 generalmente conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo,
 10 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa,
 análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos,
 azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas,
 azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedo-heptulosas,
 análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos como metil
 15 ribósido. Se pueden reemplazar uno o más enlaces fosfodiéster
 por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace
 alternativos incluyen, pero no se limitan a, modalidades en
 las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S
 ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂
 20 ("formacetal"), en donde cada R o R' es independientemente H o
 alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene
 opcionalmente un enlace de éter (-O-), arilo, alquenilo,
 cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que
 todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La
 25 descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a

los que se hace referencia en este documento, incluidos el ARN y el ADN.

Aislado (ácido nucleico)

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella
5 que se ha separado de un componente de su entorno natural. Una
molécula de ácido nucleico aislada incluye además una molécula
de ácido nucleico contenida en células que normalmente
contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de
ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una
10 ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación
cromosómica natural.

Vector

El término "vector", tal como se usa en este
documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz
15 de propagar otro ácido nucleico al que está unido. El término
incluye el vector como una estructura de ácido nucleico
autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma
de una célula hospedera en donde se ha introducido. Ciertos
vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos
20 nucleicos a los que están unidos operativamente. Tales
vectores se denominan en el presente documento "vectores de
expresión". Los vectores podrían introducirse en las células
hospederas usando virus o electroporación. Sin embargo, la
introducción de vectores no se limita al método *in vitro*. Por
25 ejemplo, los vectores también podrían introducirse en un sujeto

usando un método *in vivo* directamente.

Célula hospedera

Los términos "célula hospedera", "línea celular hospedera" y "cultivo de células hospederas" se usan
5 indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de tales células. Las células hospederas incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de la misma
10 sin tener en cuenta el número de pases. La progenie puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula madre, pero puede contener mutaciones. Se incluye aquí la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula
15 originalmente transformada.

Especificidad

"Específico" significa que una molécula que se une específicamente a una o más parejas de unión no muestra ninguna unión significativa a moléculas distintas de las parejas.
20 Además, "específico" también se usa cuando un sitio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular de varios epítopos contenidos en un antígeno. Si una molécula de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno, también se describe como "la molécula de unión a antígeno tiene/muestra
25 especificidad hacia/hacia el antígeno". Cuando un epítipo

unido por un sitio de unión a antígeno está contenido en varios antígenos diferentes, una molécula de unión a antígeno que contiene el sitio de unión a antígeno puede unirse a varios antígenos que tienen el epítipo.

5 Fragmento de anticuerpo

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

15 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan aquí indistintamente para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define aquí.

20 Fragmento variable (Fv)

En este documento, el término "fragmento variable (Fv)" se refiere a la unidad mínima de un sitio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo que está compuesto por un par de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo

(VL) y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (VH). En 1988, Skerra y Pluckthun encontraron que se pueden preparar anticuerpos homogéneos y activos a partir de la fracción de periplasma de *E. coli* insertando un gen de anticuerpo hacia abajo de una secuencia señal bacteriana e induciendo la expresión del gen en *E. coli* (Science (1988) 240 (4855), 1038-1041). En el Fv preparado a partir de la fracción de periplasma, VH se asocia con VL de manera que se una a un antígeno.

10 scFv, anticuerpo monocatenario y sc(Fv)₂

En este documento, los términos "scFv", "anticuerpo monocatenario" y "sc(Fv)₂" se refieren todos a un fragmento de anticuerpo de una única cadena de polipéptidos que contiene regiones variables derivadas de las cadenas pesada y ligera, pero no de la región constante. En general, un anticuerpo monocatenario también contiene un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL, que permite la formación de una estructura deseada que se cree que permite la unión al antígeno. Pluckthun analiza en detalle el anticuerpo monocatenario en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, 269-315 (1994)". Véase también la publicación de patente internacional WO 1988/001649; patentes estadounidenses Nos. 4,946,778 y 5,260,203. En una modalidad particular, el anticuerpo monocatenario puede ser biespecífico y/o humanizado.

scFv es un anticuerpo monocatenario de bajo peso molecular en donde VH y VL que forman Fv están unidos entre sí mediante un enlazador peptídico (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85 (16), 5879-5883). El péptido enlazador puede retener
 5 VH y VL en estrecha proximidad.

sc(Fv)₂ es un anticuerpo monocatenario en el que cuatro regiones variables de dos VL y dos VH están unidas por enlazadores tales como enlazadores peptídicos para formar una sola cadena (J Immunol. Methods (1999) 231 (1-2), 177-189).
 10 Los dos VH y los dos VL pueden derivarse de diferentes anticuerpos monoclonales. Tal sc(Fv)₂ incluye preferiblemente, por ejemplo, un sc(Fv)₂ biespecífico que reconoce dos epítomos presentes en un solo antígeno como se describe en el Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374. sc(Fv)₂ se puede
 15 producir mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sc(Fv)₂ puede producirse uniendo scFv mediante un enlazador tal como un enlazador peptídico.

Aquí, un sc(Fv)₂ incluye dos unidades VH y dos unidades VL que están dispuestas en el orden de VH, VL, VH y
 20 VL ([VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]) comenzando desde el extremo N-terminal de un polipéptido monocatenario. El orden de las dos unidades VH y las dos unidades VL no se limita a la forma anterior, y pueden disponerse en cualquier orden. A continuación se enumeran
 25 ejemplos de la forma.

[VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]

[VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]

[VH]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]

[VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VH]

5 [VL]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VH]

La forma molecular de $sc(Fv)_2$ también se describe en detalle en el documento WO 2006/132352. De acuerdo con estas descripciones, los expertos en la técnica pueden preparar apropiadamente el $sc(Fv)_2$ deseado para producir los complejos
10 polipeptídicos descritos en este documento.

Además, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con un polímero portador tal como PEG o un compuesto orgánico tal como un agente anticáncer. Como alternativa, se inserta
15 preferiblemente una secuencia de adición de cadena de azúcar en las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos de manera que la cadena de azúcar produzca el efecto deseado.

Los enlazadores que se usarán para unir las regiones variables de un anticuerpo comprenden enlazadores peptídicos
20 arbitrarios que pueden introducirse mediante ingeniería genética, enlazadores sintéticos y enlazadores descritos en, por ejemplo, Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996. Sin embargo, se prefieren enlazadores peptídicos en la presente invención. La longitud de los enlazadores peptídicos no está
25 particularmente limitada, y los expertos en la técnica pueden

seleccionarla adecuadamente de acuerdo con el propósito. La longitud es preferiblemente de cinco aminoácidos o más (sin limitación particular, el límite superior es generalmente de 30 aminoácidos o menos, preferiblemente de 20 aminoácidos o 5 menos), y particularmente preferiblemente de 15 aminoácidos. Cuando $sc(Fv)_2$ contiene tres enlazadores peptídicos, su longitud puede ser igual o diferente.

Por ejemplo, tales enlazadores de péptidos incluyen:

Ser
 10 Gly Ser
 Gly Gly Ser
 Ser Gly Gly
 Gly Gly Gly Ser (SEC ID NO: 147)
 Ser Gly Gly Gly (SEC ID NO: 148)
 15 Gly Gly Gly Gly Ser (SEC ID NO: 149)
 Ser Gly Gly Gly Gly (SEC ID NO: 150)
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEC ID NO: 151)
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly (SEC ID NO: 152)
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEC ID NO: 153)
 20 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly (SEC ID NO: 154)
 (Gly Gly Gly Gly Ser (SEC ID NO: 149)) n
 (Ser Gly Gly Gly Gly (SEC ID NO: 150)) n

en donde n es un número entero de 1 o mayor. Los expertos en la técnica pueden seleccionar en consecuencia la 25 longitud o las secuencias de los enlazadores peptídicos

dependiendo del propósito.

Los enlazadores sintéticos (agentes de reticulación químicos) se usan habitualmente para reticular péptidos, y los ejemplos incluyen:

- 5 N-hidroxisuccinimida (NHS),
- suberato de disuccinimidilo (DSS),
- suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3),
- ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP),
- ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP),
- 10 bis(succinimidil succinato)de etilenglicol (EGS),
- bis(sulfosuccinimidil succinato) de etilenglicol
- (sulfo-EGS),
- tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de
- disulfosuccinimidilo (sulfo-DST),
- 15 bis[2-(succinimidoxycarboniloxi)etil]sulfona
- (BSOCOES), y
- bis[2-(sulfosuccinimidoxycarboniloxi)etil]sulfona
- (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están
- disponibles comercialmente.

- 20 En general, se requieren tres conectores para unir
- cuatro regiones variables de anticuerpo. Los enlazadores que
- se usarán pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes.

Fab, F(ab')₂ y Fab'

- "Fab" consiste en una única cadena ligera y un
- 25 dominio CH1 y una región variable de una única cadena pesada.

La cadena pesada de la molécula Fab no puede formar enlaces disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

"F(ab')₂" o "Fab" se produce al tratar una inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) con una proteasa tal como pepsina y papaína, y se refiere a un fragmento de anticuerpo generado al digerir una inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) cerca de los enlaces disulfuro presente entre las regiones de bisagra en cada una de las dos cadenas H. Por ejemplo, la papaína escinde la IgG en dirección 5' de los enlaces disulfuro presentes entre las regiones bisagra en cada una de las dos cadenas H para generar dos fragmentos de anticuerpos homólogos, en los que una cadena L que comprende VL (región variable de la cadena L) y CL (región constante de la cadena L) está unido a un fragmento de cadena H que comprende VH (región variable de la cadena H) y CH gamma 1 (región gamma 1 en una región constante de la cadena H) mediante un enlace disulfuro en sus regiones C-terminales. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpos homólogos se denomina Fab'.

"F(ab')₂" consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden la región constante de un dominio CH1 y una porción de dominios CH2 de tal manera que se forman enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. El F(ab')₂ descrito en el presente documento se puede producir preferiblemente como sigue. Un anticuerpo monoclonal completo o tal que comprende un sitio de unión a antígeno deseado se

digiere parcialmente con una proteasa tal como pepsina; y los fragmentos Fc se eliminan por adsorción en una columna de Proteína A. La proteasa no está particularmente limitada, siempre que pueda escindir el anticuerpo completo de una manera selectiva para producir $F(ab')_2$ en una condición de reacción enzimática de configuración adecuada, tal como el pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Región Fc

El término "región Fc" o "dominio Fc" en este documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una modalidad, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina-lisina (residuos 446-447) de la región Fc pueden estar presentes o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante se lleva a cabo de acuerdo con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, 1991.

Receptor Fc

El término "receptor Fc" o "FcR" se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas modalidades, un FcR es un FcR humano nativo. En algunas
5 modalidades, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc gamma RI, Fc gamma RII y Fc gamma RIII, que incluyen variantes alélicas y formas empalmadas como alternativa de esos receptores. Los receptores Fc gamma RII incluyen Fc gamma RIIA
10 (un "receptor activador") y Fc gamma RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc gamma RIIA contiene un motivo de activación inmunorreceptor con base en tirosina (ITAM) en su
15 dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc gamma RIIB contiene un motivo de inhibición inmunorreceptor a base de tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase, por ejemplo, Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcRs se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol
20 9: 457 - 92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25 - 34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995). Otros FcRs, incluidos los que se identificarán en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento.

25 El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el

receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249 (1994)) y regulación de la homeostasis de inmunoglobulinas. Se conocen métodos para
 5 medir la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward., Immunol. Today 18 (12): 592-598 (1997); Ghetie *et al.*, Nature Biotechnology, 15 (7): 637-640 (1997); Hinton *et al.*, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*)).

La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida
 10 plasmática de polipéptidos de unión de alta afinidad de FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos con una región Fc variante. El documento WO 2000/42072
 15 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión aumentada o disminuida a FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001).

Receptor Fc gamma

Receptor Fc gamma se refiere a un receptor capaz de
 20 unirse al dominio Fc de anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, e incluye todos los miembros que pertenecen a la familia de proteínas codificadas sustancialmente por un gen del receptor Fc gamma. En humanos, la familia incluye Fc gamma RI (CD64) que incluye las isoformas Fc gamma RIa, Fc gamma RIb
 25 y Fc gamma RIc; Fc gamma RII (CD32) que incluye las isoformas

Fc gamma RIIa (que incluye el alotipo H131 y R131), Fc gamma RIIb (que incluye Fc gamma RIIb-1 y Fc gamma RIIb-2) y Fc gamma RIIC; y Fc gamma RIII (CD16) que incluye la isoforma Fc gamma RIIIa (que incluye el alotipo V158 y F158) y Fc gamma RIIb

5 (que incluye el alotipo Fc gamma RIIb-NA1 y Fc gamma RIIb-NA2); así como todos los receptores gamma de Fc humanos no identificados, isoformas del receptor gamma de Fc y alotipos de los mismos. Sin embargo, el receptor Fc gamma no se limita a estos ejemplos. Sin limitarse a ello, el receptor Fc gamma

10 incluye los derivados de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. El receptor de Fc gamma puede derivarse de cualquier organismo. El receptor Fc gamma de ratón incluye, entre otros, Fc gamma RI (CD64), Fc gamma RII (CD32), Fc gamma RIII (CD16) y Fc gamma RIII-2 (CD16-2), así como todos los receptores Fc

15 gamma de ratón no identificados, isoformas del receptor Fc gamma y alotipos de los mismos. Tales receptores gamma de Fc preferidos incluyen, por ejemplo, Fc gamma RI humano (CD64), Fc gamma RIIA (CD32), Fc gamma RIIB (CD32), Fc gamma RIIIA (CD16) y/o Fc gamma RIIIB (CD16). La secuencia de

20 polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fc gamma RI se muestran en el número de registro de RefSeq NM_000566.3 y el número de registro de RefSeq NP_000557.1, respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fc gamma RIIA se muestran en el número de registro de RefSeq

25 BC020823.1 y el número de registro de RefSeq AAH20823.1,

respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fc gamma RIIB se muestran en el número de registro de RefSeq BC146678.1 y el número de registro de RefSeq AAI46679.1, respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fc gamma RIIIA se muestran en el número de registro de RefSeq BC033678.1 y el número de registro de RefSeq AAH33678.1, respectivamente; y la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fc gamma RIIIB se muestran en el número de registro de RefSeq BC128562.1 y el número de registro de RefSeq AAI28563.1, respectivamente. Si un receptor de Fc gamma tiene actividad de unión al dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, se puede evaluar mediante el tamizado ALPHA (Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), el método BIACORE a base de resonancia de plasmón de superficie (SPR) y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010), además de los formatos FACS y ELISA descritos anteriormente.

Mientras tanto, "ligando Fc" o "ligando efector" se refiere a una molécula y preferiblemente un polipéptido que se une a un dominio Fc de anticuerpo, formando un complejo de ligando Fc/Fc. La molécula se puede derivar de cualquier organismo. La unión de un ligando Fc a Fc induce preferiblemente una o más funciones efectoras. Tales ligandos de Fc incluyen, pero no se limitan a, receptores de Fc, receptor de Fc gamma, receptor de Fc alfa, receptor de Fc beta, FcRn,

Clq y C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de *Staphylococcus*, proteína G de *Staphylococcus* y receptores gamma de Fc virales. Los ligandos Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH) (Davis et al., (2002)

5 Immunological Reviews 190, 123-136), que son una familia de receptores Fc homólogos al receptor Fc gamma. Los ligandos de Fc también incluyen moléculas no identificadas que se unen a Fc.

Actividad de unión al receptor Fc gamma

10 La actividad de unión deteriorada del dominio Fc a cualquiera de los receptores Fc gamma Fc gamma RI, Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIB, Fc gamma RIIIA y/o Fc gamma RIIIB puede evaluarse usando los formatos FACS y ELISA descritos anteriormente así como el tamizado ALPHA (Ensayo homogéneo de

15 proximidad luminiscente amplificada) y el método BIACORE a base de resonancia de plasmón superficial (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010).

El tamizado ALPHA se lleva a cabo mediante la tecnología ALPHA basada en el principio que se describe a

20 continuación usando dos tipos de perlas: perlas donantes y aceptoras. Se detecta una señal luminiscente solo cuando las moléculas unidas a las perlas donantes interactúan biológicamente con moléculas unidas a las perlas aceptoras y cuando las dos perlas se encuentran muy próximas. Estimulado

25 por el rayo láser, el fotosensibilizador en una perla donante

convierte el oxígeno alrededor de la perla en oxígeno singlete excitado. Cuando el oxígeno singlete se difunde alrededor de las perlas donantes y alcanza las perlasceptoras ubicadas muy cerca, se induce una reacción quimioluminiscente dentro de las perlasceptoras. Esta reacción finalmente da como resultado una emisión de luz. Si las moléculas unidas a las perlas donantes no interactúan con las moléculas unidas a las perlasceptoras, el oxígeno singlete producido por las perlas donantes no llega a las perlasceptoras y no se produce la reacción quimioluminiscente.

Por ejemplo, una molécula de unión a antígeno o anticuerpo marcado con biotina se inmoviliza en las perlas del donante y el receptor Fc gamma marcado con glutatión S-transferasa (GST) se inmoviliza en las perlasceptoras. En ausencia de una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que comprenda un dominio Fc mutante competitivo, el receptor gamma de Fc interactúa con una molécula de unión a antígeno o anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo salvaje, induciendo una señal de 520 a 620 nm como resultado. La molécula de unión a antígeno o anticuerpo que tiene un dominio Fc mutante no marcado compite con la molécula de unión a antígeno o anticuerpo que comprende un dominio Fc de tipo salvaje por la interacción con el receptor Fc gamma. La afinidad de unión relativa se puede determinar cuantificando la reducción de la fluorescencia como resultado de la

competencia. Se conocen métodos para biotinilar las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos tales como anticuerpos usando Sulfo-NHS-biotina o similares. Los métodos apropiados para agregar la etiqueta GST a un receptor Fc gamma incluyen métodos
5 que implican fusionar polipéptidos que codifican para el receptor Fc gamma y GST en marco, expresar el gen fusionado usando células introducidas con un vector que lleva el gen y luego purificar usando una columna de glutatión. La señal inducida se puede analizar preferiblemente, por ejemplo,
10 ajustándose a un modelo de competencia de un sitio con base en análisis de regresión no lineal usando software tal como GRAPHPAD PRISM (GraphPad; San Diego).

Una de las sustancias para observar su interacción está inmovilizada como ligando sobre la fina capa dorada de un
15 chip sensor. Cuando se emite luz sobre la superficie trasera del chip sensor de tal manera que se produce una reflexión total en la interfaz entre la capa fina de oro y el vidrio, la intensidad de la luz reflejada se reduce parcialmente en un determinado sitio (señal SPR). La otra sustancia para observar
20 su interacción se inyecta como analito en la superficie del chip sensor. La masa de molécula de ligando inmovilizada aumenta cuando el analito se une al ligando. Esto altera el índice de refracción del solvente en la superficie del chip sensor. El cambio en el índice de refracción provoca un cambio
25 posicional de la señal SPR (a la inversa, la disociación

desplaza la señal de nuevo a la posición original). En el sistema Biacore, la cantidad de desplazamiento descrita anteriormente (es decir, el cambio de masa en la superficie del chip sensor) se traza en el eje vertical y, por lo tanto, el cambio de masa a lo largo del tiempo se muestra como datos medidos (sensorgrama). Los parámetros cinéticos (constante de velocidad de asociación (k_a) y constante de velocidad de disociación (k_d)) se determinan a partir de la curva del sensorgrama, y la afinidad (KD) se determina a partir de la relación entre estas dos constantes. El ensayo de inhibición se usa preferiblemente en los métodos BIACORE. Se describen ejemplos de tal ensayo de inhibición en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010.

Región Fc con una actividad de unión al receptor Fc gamma reducida

En este documento, "una actividad de unión al receptor de Fc gamma reducida" significa, por ejemplo, que con base en el método de análisis descrito anteriormente, la actividad competitiva de una molécula de unión a antígeno de prueba o un anticuerpo es del 50% o menos, preferiblemente del 45% o menos, 40% o menos, 35% o menos, 30% o menos, 20% o menos, o 15% o menos, y de manera particularmente preferible 10% o menos, 9% o menos, 8% o menos, 7% o menos, 6 % o menos, 5% o menos, 4% o menos, 3% o menos, 2% o menos, o 1% o menos que la actividad competitiva de una molécula o anticuerpo de

unión a antígeno de control.

Las moléculas de unión a antígeno o los anticuerpos que comprenden el dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 pueden usarse de manera apropiada como

5 moléculas de control de unión a antígeno o anticuerpos. Las estructuras del dominio Fc se muestran en SEC ID NOs: 143 (A se agrega al extremo N-terminal del número de registro de RefSeq AAC82527.1), 144 (A se agrega al extremo N-terminal del número de registro de RefSeq AAB59393.1), 145 (A se agrega al

10 extremo N-terminal del número de registro de RefSeq CAA27268.1), y 146 (se agrega A al extremo N-terminal del número de registro de RefSeq AAB59394.1). Además, cuando una molécula de unión a antígeno o un anticuerpo que comprende un mutante de dominio Fc de un anticuerpo de un isotipo particular

15 se usa como sustancia de prueba, el efecto de la mutación del mutante sobre la actividad de unión al receptor de Fc gamma se evalúa usando como controlar una molécula de unión a antígeno o un anticuerpo que comprende un dominio Fc del mismo isotipo. Como se describió anteriormente, se preparan apropiadamente

20 moléculas de unión a antígeno o anticuerpos que comprenden un mutante del dominio Fc cuya actividad de unión al receptor de Fc gamma se ha considerado reducida.

Tales mutantes conocidos incluyen, por ejemplo, mutantes que tienen una supresión de los aminoácidos 231A-238S

25 (numeración EU) (WO 2009/011941), así como mutantes C226S,

C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol (2007) 34, 11); C226S y C229S (Hum. Antibod. Hybridomas (1990) 1 (1), 47-54); C226S, C229S, E233P, L234V y L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192).

Específicamente, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc con una mutación (tal como sustitución) de al menos un aminoácido seleccionado de las siguientes posiciones de aminoácido: 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331, o 332 (numeración EU), en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo de un isotipo particular. El isotipo de anticuerpo del que se origina el dominio Fc no está particularmente limitado, y es posible usar un dominio Fc apropiado derivado de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Es preferible usar dominios Fc derivados de anticuerpos IgG1.

Las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc que tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican de acuerdo con la numeración EU (cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración EU; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número

representa el residuo de aminoácido después de la sustitución) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de anticuerpo IgG1:

- (a) L234F, L235E, P331S;
- (b) C226S, C229S, P238S;
- 5 (c) C226S, C229S; o
- (d) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

así como aquellos que tienen un dominio Fc que tiene una supresión de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 231 a 238.

- 10 Además, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos también incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc que tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican de acuerdo con la numeración EU en los
- 15 aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG2:

- (e) H268Q, V309L, A330S y P331S;
- (f) V234A;
- (g) G237A;
- (h) V234A y G237A;
- 20 (i) A235E y G237A; o
- (j) V234A, A235E y G237A. Cada número representa la

posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución,

25 mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del

número representa el residuo de aminoácido después de la sustitución.

Además, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos también incluyen aquellos que
 5 comprenden un dominio Fc que tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican de acuerdo con la numeración EU en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG3:

(k) F241A;

10 (l) D265A; o

(m) V264A. Cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el
 15 símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido después de la sustitución.

Además, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos también incluyen aquellos que
 20 comprenden un dominio Fc que tiene cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican de acuerdo con la numeración EU en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG4:

(n) L235A, G237A y E318A;

(o) L235E; o

25 (p) F234A y L235A. Cada número representa la

posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del
5 número representa el residuo de aminoácido después de la sustitución.

Las otras moléculas de unión a antígeno o anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc en donde cualquier aminoácido en la posición 233,
10 234, 235, 236, 237, 327, 330 o 331 (numeración EU) en los aminoácidos que forma el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 se sustituye con un aminoácido de la posición correspondiente en la numeración EU en la IgG2 o IgG4 correspondiente.

Las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos
15 preferidos también incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc en donde uno o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 (numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 se sustituye por otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después
20 de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren particularmente las moléculas de unión a antígeno o los anticuerpos que comprenden un dominio Fc en donde uno cualquiera o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 están sustituidos con alanina.

25 Las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos

preferidos también incluyen, por ejemplo, aquellas que comprenden un dominio Fc en donde un aminoácido en la posición 265 (numeración EU) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 está sustituido con otro aminoácido.

- 5 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren particularmente las moléculas de unión a antígeno o los anticuerpos que comprenden un dominio Fc en donde un aminoácido en la posición 265 está sustituido con alanina.

10 Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

- La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en donde la Ig secretada se une a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células NK, neutrófilos y macrófagos) habilita estas células efectoras citotóxicas. para unirse específicamente a una célula objetivo portadora de antígeno y posteriormente matar la célula objetivo con citotoxinas. Las células primarias para mediar ADCC, las células NK, expresan Fc gamma RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc gamma RI, Fc gamma RII y Fc gamma RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457 - 92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC

in vitro, tal como el descrito en la patente estadounidense No. 5,500,362 o 5,821,337 o la patente estadounidense No. 6,737,056 (Presta). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células PBMC y NK. Como alternativa, o
5 adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

Citotoxicidad dependiente del complemento

10 "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia de complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los
15 anticuerpos (de la subclase apropiada), que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). Las variantes de polipéptidos con
20 secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas (polipéptidos con una región Fc variante) y capacidad de unión de C1q aumentada o disminuida se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense No. 6,194,551 B1 y WO 1999/51642. Véase también, por ejemplo, Idusogie *et al.* J.
25 Immunol. 164: 4178 - 4184 (2000).

Citotoxicidad celular dependiente de células T

"Citotoxicidad celular dependiente de células T" o "TDCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en donde una molécula de unión a antígeno se une tanto a un antígeno expresado en la célula objetivo como a otro antígeno expresado en la célula T, que redirige la célula T cerca de la célula objetivo, ya que la citotoxicidad contra la célula objetivo es inducida debido a la célula T. El método para evaluar la citotoxicidad celular dependiente de células T, un ensayo TDCC *in vitro*, también se describe en la sección "Medición de la citotoxicidad celular dependiente de células T" de esta descripción.

Punto isoeléctrico (pI)

A menos que se especifique lo contrario y salvo que existan inconsistencias en el contexto, se entiende que el punto isoeléctrico (pI) puede ser un punto isoeléctrico teórico o determinado experimentalmente, y también se denomina "pI". El valor pI se puede determinar experimentalmente, por ejemplo, mediante electroforesis de enfoque isoeléctrico. Mientras tanto, el valor de pI teórico se puede calcular usando software de análisis de secuencias de aminoácidos y genes (Genetyx, etc.).

Cáncer

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se

caracteriza típicamente por un crecimiento/proliferación celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Tumor

El término "tumor" se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se hace referencia en este documento.

Cáncer de ovario

"Cáncer de ovario" se refiere a un grupo heterogéneo de tumores malignos derivados del ovario. Aproximadamente el 90% de los tumores de ovario malignos son de origen epitelial; el resto son tumores de células germinales y estromales. Los tumores epiteliales de ovario se clasifican en los siguientes subtipos histológicos: adenocarcinomas serosos (que constituyen aproximadamente el 50% de los tumores epiteliales de ovario); adenocarcinomas endometrioides (~20%); adenocarcinomas mucinosos (~10%); carcinomas de células claras (~5-10%); tumores de Brenner (células de transición) (relativamente poco frecuentes). El pronóstico del cáncer de ovario, que es el sexto cáncer más común en mujeres, suele ser malo, con tasas de supervivencia a cinco años que oscilan entre el 5 y el 30%. Para revisiones del cáncer de ovario, consulte Fox *et al.* (2002) "Pathology of epithelial ovarian cancer," en *Ovarian Cancer* c. 9 (Jacobs *et al.*, eds., Oxford University Press, Nueva York); Morin *et al.* (2001) "Ovarian Cancer," en *Encyclopedic Reference of Cancer*, pp.654-656 (Schwab, ed., Springer-Verlag, Nueva York). La presente invención contempla métodos para diagnosticar o tratar cualquiera de los subtipos de tumores epiteliales de ovario descritos anteriormente y, en particular, el subtipo de adenocarcinoma seroso.

Cáncer gástrico

El término "cáncer gástrico" o "tumor gástrico" o

"tumor de estómago" o "cáncer de estómago" se refiere a cualquier tumor o cáncer de estómago, incluidos, por ejemplo, adenocarcinomas (tales como de tipo difuso y de tipo intestinal), y formas menos prevalentes como linfomas, 5 leiomiosarcomas y carcinomas de células escamosas.

Formulación farmacéutica

El término "formulación farmacéutica" o "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica de un 10 ingrediente activo contenido en el mismo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto que se administraría la formulación.

Portador farmacéuticamente aceptable

Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere 15 a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un amortiguador, excipiente, estabilizador o conservador.

Tratamiento

20 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que está siendo tratado, y se puede llevar a cabo para la profilaxis o durante 25 el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del

tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejor pronóstico. En algunas modalidades, las moléculas de unión a antígeno o los anticuerpos de la presente invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

Prospecto

El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de esos productos terapéuticos.

Anticuerpo de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende: una primera región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; una primera región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; una segunda región

variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de SEC ID NO: 122, 123 y 124, respectivamente; y una segunda región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOs: 114, 115 y 116, respectivamente.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que comprende: una primera región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1, 33 y 84; y una primera región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86 y 88; una segunda región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 60 y 70; y una segunda región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 61 y 71.

En ciertas modalidades, la primera región variable de la cadena pesada está unida a un primer dominio CH1 mostrado en SEC ID NO: 95, la primera región variable de la cadena ligera está enlazada a un primer dominio CL mostrado en SEC ID NO: 63, la segunda región variable de la cadena pesada está unida a un segundo dominio CH1 que se muestra en la SEC ID NO: 97, y la segunda región variable de la cadena ligera está unida a un segundo dominio CL que se muestra en la SEC ID NO: 62.

En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende

además cualquiera de las combinaciones de regiones Fc seleccionadas de:

(1) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 72 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 73;

5 (2) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 74 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 75;

(3) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 76 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 77; y

(4) una primera región Fc mostrada en SEC ID NO: 78
10 y una segunda región Fc mostrada en SEC ID NO: 79.

La primera región Fc podría estar en la misma cadena de polipéptidos con la primera región variable de la cadena pesada, y la segunda región Fc podría estar en la misma cadena de polipéptidos con la segunda región variable de la cadena
15 pesada. En determinadas modalidades, la lisina C-terminal (Lys447) o la glicina-lisina (residuos 446-447) de la región Fc pueden no estar presentes.

En determinadas modalidades, la primera región variable de la cadena pesada y la primera región variable de
20 la cadena ligera forman un primer sitio de unión a antígeno, y la segunda región variable de la cadena pesada y la segunda región variable de la cadena ligera forman un segundo sitio de unión a antígeno.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo
25 aislado que comprende: una primera cadena pesada que comprende

la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 104, 105, 106 y 107 y una primera cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID NO: 112; una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 108, 109, 110 y 111 y una segunda cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 98. En ciertas modalidades, la lisina C-terminal (Lys447) o glicina-lisina (residuos 446-447) de la cadena pesada pueden no estar presentes.

10 Las regiones variables de la primera cadena pesada y la primera cadena ligera forman un primer sitio de unión a antígeno, y las regiones variables de la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera forman un segundo sitio de unión a antígeno.

15 En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana. En ciertas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NO: 125 o 126. En ciertas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN9 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a CLDN4 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno no se une

20

25

sustancialmente a CLDN3 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en la SEC ID NO: 134.

En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CD3. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia la cadena épsilon de CD3. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno tiene actividad de unión hacia CD3 humano como se define en SEC ID NO: 142.

Molécula de unión a antígeno de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; o

(a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y

HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; o

(b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54, 82, 86, 88 y 58.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde:

la región variable de la cadena pesada comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; y

(a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85;

y la región variable de la cadena ligera que comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; y

(b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54, 82, 86, 88 y 58.

5 En determinadas modalidades, la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de la molécula de unión a antígeno comprenden estructuras de ratón, conejo, humanizadas o humanas.

10 En un aspecto, la invención proporciona una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1, 33, 84, 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83 y 57, y una región variable de la cadena ligera que comprende la
15 secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86, 88, 92, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 54, 82 y 58.

20 Una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera de la molécula de unión a antígeno forman un sitio de unión a antígeno, que tiene actividad de unión hacia CLDN6. En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NO: 125 o 126.

25 En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN9 humana. En determinadas modalidades, la molécula de unión a

antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN4 humana. En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN3 humana. En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en SEC ID NO: 134.

La molécula de unión a antígeno de la invención puede usarse en combinación con diversas tecnologías de uso médico conocidas. En determinadas modalidades, las moléculas de unión a antígeno de la invención podrían usarse para producir un receptor de unión a antígeno quimérico (CAR) y un receptor de unión a antígeno quimérico que comprende células T (CAR-T). Como ejemplo del método para producir CAR, el sitio de unión a CLDN6 de las moléculas de unión a antígeno de la invención está vinculado con el dominio extracelular del receptor de células T (TCR), y el dominio de señalización coestimuladora, tal como CD28, está enlazado al dominio intracelular del TCR. Como ejemplo del método para fabricar CAR-T, CAR se introduce en células efectoras, tal como las células T, usando tecnología de modificación genética.

En un aspecto, la invención proporciona un receptor de unión a antígeno quimérico que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118,

respectivamente; o

(a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44,
5 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85.

En un aspecto, la invención proporciona un receptor de unión a antígeno quimérico que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y
10 HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; o

(b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54,
15 82, 86, 88 y 58.

En un aspecto, la invención proporciona un receptor de unión a antígeno quimérico que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde:

20 comprendiendo la región variable de la cadena pesada cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; y

25 (a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de

cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85;

y la región variable de la cadena ligera que
5 comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; y

10 (b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54, 82, 86, 88 y 58.

En un aspecto, la invención proporciona un receptor
15 de unión a antígeno quimérico que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85, 1, 33, 84, 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83 y 57, y una región variable de la cadena ligera que comprende la
20 secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86, 88, 92, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 54, 82 y 58.

En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención es una molécula de unión a antígeno que comprende una pluralidad de sitios de unión a antígeno.

25 En ciertas modalidades, la molécula de unión a

antígeno de la invención comprende un primer sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia CLDN6, y un segundo sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia el complejo receptor de células T, en donde la primera unión
5 de antígeno el sitio comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(a1) secuencias de aminoácidos de HVR-H1, HVR-H2 y
10 HVR-H3 mostradas en SEC ID NOs: 113, 117 y 118, respectivamente; y

(a2) HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada mostradas en SEC ID NOs: 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44,
15 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83, 84, 57 y 85;

y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende cualquiera de las combinaciones de HVR seleccionadas de:

(b1) secuencias de aminoácidos de HVR-L1, HVR-L2 y
20 HVR-L3 mostradas en SEC ID NOs: 119, 120 y 121, respectivamente; y

(b2) HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 son iguales a las de cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera
25 mostradas en SEC ID NOs: 92, 41, 42, 43, 46, 51, 52, 53, 54,

82, 86, 88 y 58.

En determinadas modalidades, la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera que forma el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención comprende además armazones de
5 ratón, conejo, humanizados o humanos.

En ciertas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención comprende un primer sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia CLDN6, y un segundo
10 sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia el complejo receptor de células T,

en donde el primer sitio de unión a antígeno comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 85,
15 1, 33, 84, 91, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 64, 65, 83 y 57 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 87, 2, 43, 86, 88, 92, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 54, 82 y 58.

20 En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión hacia CLDN6 humana. En ciertas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión
25 hacia CLDN6 humana como se define en SEC ID NO: 125 o 126. En

ciertas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN9 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN4 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a CLDN3 humana. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención no se une sustancialmente a un mutante de CLDN6 como se define en SEC ID NO: 134.

En determinadas modalidades, el primer sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención se incluye en un Fv de cadena sencilla (scFv), Fv o Fab.

En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión hacia CD3. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión hacia la cadena épsilon de CD3. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de unión hacia el receptor de células T.

En cierta modalidad, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención

está formado por una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de SEC ID NOs: 122, 123 y 124, respectivamente; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos HVR-L1, HVR-L2 y HVR-L3 de SEC ID NOs: 114, 115 y 116, respectivamente. En cierta modalidad, la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera que forman el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención comprenden armazones de ratón, conejo, humanizados o humanos.

En cierta modalidad, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención está formado por una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 60 y 70 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NOs: 61 y 71.

En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión a antígeno de la molécula de unión a antígeno de la invención se incluye en un Fv de cadena sencilla (scFv), Fv o Fab.

En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención comprende además una región Fc de anticuerpo. En determinadas modalidades, la región Fc comprendida en la molécula de unión a antígeno de la invención

es una región Fc que constituye los aminoácidos de SEC ID NOs: 143, 144, 145 o 146 (IgG1 a IgG4). En determinadas modalidades, la región Fc comprendida en la molécula de unión a antígeno de la invención es una región Fc con al menos una mutación de aminoácido en cualquiera de las regiones Fc que constituyen los aminoácidos de SEC ID NOs: 143 a 146 (IgG1 a IgG4). En ciertas modalidades, la región Fc comprendida en la molécula de unión a antígeno de la invención es una región Fc a la que se une la cadena de azúcar, y el porcentaje de cadena de azúcar deficiente en fucosa unida a la región Fc es mayor que el de una región Fc de IgG nativa, o el porcentaje de N-acetilglucosamina bisectante añadido a la región Fc es mayor que el de una región Fc de IgG nativa.

En ciertas modalidades, especialmente en algunas modalidades en las que la molécula de unión a antígeno comprende un primer sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia CLDN6 y un segundo sitio de unión a antígeno que tiene actividad de unión hacia el complejo receptor de células T, la región Fc comprendida en la molécula de unión a antígeno es una región Fc con actividad de unión reducida hacia un receptor Fc gamma.

En ciertas modalidades, la región Fc comprendida en la molécula de unión a antígeno es una región Fc con mutación de al menos un aminoácido seleccionado de las siguientes posiciones de aminoácidos especificadas por la numeración EU:

posición 220, posición 226, posición 229, posición 231,
 posición 232, posición 233, posición 234, posición 235,
 posición 236, posición 237, posición 238, posición 239,
 posición 240, posición 264, posición 265, posición 266,
 5 posición 267, posición 269, posición 270, posición 295,
 posición 296, posición 297, posición 298, posición 299,
 posición 300, posición 325, posición 327, posición 328,
 posición 329, posición 330, posición 331 y posición 332.

En ciertas modalidades, la región Fc comprendida en
 10 la molécula de unión a antígeno es una región Fc que comprende
 al menos un aminoácido seleccionado de los siguientes
 aminoácidos especificados por la numeración EU: Arg en la
 posición del aminoácido 234, Ala o Arg en la posición del
 aminoácido 235, Lys en la posición del aminoácido 239 y Ala en
 15 la posición del aminoácido 297.

En determinadas modalidades, el dominio variable de
 la cadena pesada que forma el primer sitio de unión a antígeno
 se une a la región Fc mediante un primer dominio CH1, el dominio
 variable de la cadena ligera que forma el primer sitio de unión
 20 a antígeno se une a un primer dominio CL; y el dominio variable
 de la cadena pesada que forma el segundo sitio de unión a
 antígeno se une a la región Fc mediante un segundo dominio CH1,
 el dominio variable de la cadena ligera que forma el segundo
 sitio de unión a antígeno se une a un segundo dominio CL. En
 25 ciertas modalidades, las cargas eléctricas de los dominios CH1

y CL antes mencionados se controlan de tal manera que la región variable de la cadena pesada que forma el primer dominio de unión a antígeno se ensambla con la región variable de la cadena ligera que forma el primer dominio de unión a antígeno, 5 y/o la región variable de la cadena pesada que forma el segundo dominio de unión a antígeno se ensambla con la región variable de la cadena ligera que forma el segundo dominio de unión a antígeno.

En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad citotóxica. En 10 determinadas modalidades, la actividad citotóxica de la molécula de unión a antígeno de la invención es ADCC o CDC. En determinadas modalidades, la actividad citotóxica de la molécula de unión a antígeno de la invención es actividad 15 citotóxica dependiente de células T.

En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad internalizante. En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención se conjuga con un agente citotóxico.

20 La presente invención también proporciona inmunokonjugados que comprenden una molécula de unión a CLDN6, especialmente un anticuerpo anti-CLDN6 conjugado aquí con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, 25 toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas bacterianas

enzimáticamente activas, origen fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos) o isótopos radiactivos.

En una modalidad, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde un anticuerpo se conjuga
 5 con uno o más fármacos, que incluyen, entre otros, un maitansinoide (véanse las patentes estadounidenses números 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes estadounidenses Nos.
 10 5,635,483 y 5,780,588 y 7,498,298); una dolastatina; una caliqueamicina o un derivado de la misma (véanse las patentes estadounidenses números 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 y 5,877,296; Hinman et al., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993); y Lode et al, Cancer
 15 Res. 58: 2925 - 2928 (1998)); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et al., Current Med. Chem. 13: 477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16: 717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 20 97: 829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002); y patente estadounidense No. 6,630,579); metotrexato; vindesina; un taxano como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

25 En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un

anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de la misma, que incluye, entre otros, la cadena A de la difteria, los fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, cadena A de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se dispone de una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{212}Pb e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, Tc-99m o ^{123}I , o una etiqueta de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagenología de resonancia magnética, MRI), tal como como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio,

manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y un agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoilo)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionúclido con el anticuerpo. Ver W094/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil en ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52: 127-131 (1992); patente estadounidense

No. 5,208,020).

Los inmunoconjugados o ADCs en este documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, esos conjugados preparados con reactivos reticulantes que incluyen, entre
5 otros, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se comercializan disponible (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc.,
10 Rockford, IL., EE.UU.).

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o molécula de unión a antígeno descrita en el presente documento. En una modalidad adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo,
15 vectores de expresión) que comprenden ese ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedera que comprende ese ácido nucleico.

En determinadas modalidades, el ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o molécula de unión a antígeno de
20 la invención puede incorporarse en vectores que pueden administrarse directamente a un sujeto. También es posible administrar células que están genéticamente modificadas para expresar y secretar un anticuerpo o molécula de unión a antígeno de la invención a un sujeto, permitiendo la secreción
25 continua *in vivo* de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno

de la invención.

La invención también proporciona un método para producir un anticuerpo o molécula de unión a antígeno descrito en el presente documento. En una modalidad adicional, el
5 método para producir un anticuerpo o molécula de unión a antígeno descrito en el presente documento comprende cultivar una célula hospedera que comprenda ácido nucleico que codifique para el antígeno o molécula de unión a antígeno. En modalidades adicionales, el método para producir un anticuerpo o molécula
10 de unión a antígeno descrito en este documento comprende cultivar una célula hospedera que comprenda ácido nucleico que codifique para el antígeno o molécula de unión a antígeno, y recuperar el anticuerpo o molécula de unión a antígeno del cultivo de célula hospedera.

15 Métodos y ensayo

Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse anticuerpos y moléculas de unión a antígeno usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense No.
20 4,816,567. En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo como se describe en el presente documento. Tal ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo,
25 las cadenas ligeras y/o pesadas del anticuerpo). En una

modalidad adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden ese ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedera que comprende ese ácido nucleico. En una de

5 tales modalidades, una célula hospedera comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que

10 comprende un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula hospedera es eucariota, por

15 ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfoide (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp2/0). En una modalidad, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CLDN6, en donde el método comprende cultivar una célula hospedera que comprenda un ácido nucleico que codifique para

20 el anticuerpo, tal como se proporcionó anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedera (o medio de cultivo de la célula hospedera).

Para la producción recombinante de un anticuerpo

25 descrito en el presente documento, el ácido nucleico que

codifica para un anticuerpo, por ejemplo, tal como se describió anteriormente, se aísla y se inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula hospedera. Tal ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando
5 procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifiquen para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células hospederas adecuadas para la clonación o
10 expresión de vectores que codifican para anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en bacterias, en particular cuando no se necesiten la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión
15 de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5,648,237, 5,789,199 y 5,840,523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (BKC Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), págs. 245-254, que describe la
20 expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar más.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas,
25 tal como los hongos filamentosos o las levaduras, son

anfitriones de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican para anticuerpos, incluidos hongos y cepas de levadura cuyas vías de glicosilación se han "humanizado", lo que da como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación completamente humano. Véase Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004) y Li et al., Nat. Biotech. 24: 210 - 215 (2006).

Las células hospederas adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados también se derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales que pueden usarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos de células vegetales también se pueden usar como anfitriones. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Las células de vertebrados también se pueden usar como anfitriones. Por ejemplo, pueden resultar útiles las líneas celulares de mamíferos que están adaptadas para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospederas

de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células renales de
5 crías de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células renales caninas
10 (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); las células TRI, tal como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44 - 68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras
15 líneas de células hospederas de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas células DHFR-CHO (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas de células
20 hospederas de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey), págs. 255-268 (2003).

La producción recombinante de una molécula de unión
25 a antígeno descrita en el presente documento podría llevarse a

cabo con métodos similares a los descritos anteriormente, usando una célula hospedera que comprenda (por ejemplo, se ha transformado con) uno o varios vectores que comprendan ácido nucleico que codifique para una secuencia de aminoácidos que
5 comprenda la molécula de unión a antígeno completa o parte de la molécula de unión a antígeno.

Producción y purificación de anticuerpos
bienespecíficos

"Moléculas multiespecíficas de unión a antígeno" se
10 refiere a moléculas de unión a antígeno que se unen específicamente a más de un antígeno. En cierta modalidad, las moléculas de unión a antígeno multiespecíficas descritas en el presente documento comprenden dos o más sitios de unión a antígeno, y diferentes sitios de unión a antígeno pueden
15 unirse específicamente a diferentes antígenos.

En determinadas modalidades, la molécula de unión a antígeno de la invención es un anticuerpo IgG bienespecífico. Los anticuerpos bienespecíficos tipo IgG pueden secretarse a partir de un hibridoma híbrido (cuadroma) producido fusionando
20 dos tipos de hibridomas que producen anticuerpos IgG (Milstein et al., Nature (1983) 305, 537-540).

Además, los anticuerpos bienespecíficos tipo IgG se secretan introduciendo los genes de las cadenas L y H que constituyen los dos tipos de IgG de interés, es decir, un total
25 de cuatro genes, en las células y coexpresándolos. Sin

embargo, el número de combinaciones de cadenas H y L de IgG que pueden producirse mediante estos métodos es teóricamente diez combinaciones. Por consiguiente, es difícil purificar una IgG que comprende la combinación deseada de cadenas H y L de diez tipos de IgG. Además, teóricamente, la cantidad de secreción de IgG que tiene la combinación deseada disminuirá notablemente y, por lo tanto, será necesario un cultivo a gran escala y los costos de producción aumentarán aún más.

Por lo tanto, se pueden aplicar técnicas para promover la asociación entre cadenas H y entre cadenas L y H que tengan las combinaciones deseadas a las moléculas multiespecíficas de unión a antígeno de la presente invención.

Por ejemplo, las técnicas para suprimir la asociación de cadena H no deseada mediante la introducción de repulsión electrostática en la interfaz de la segunda región constante o la tercera región constante de la cadena H del anticuerpo (CH2 o CH3) se pueden aplicar a la asociación de anticuerpos biespecíficos (WO2006/106905).

En la técnica de suprimir la asociación involuntaria de la cadena H mediante la introducción de repulsión electrostática en la interfaz de CH2 o CH3, los ejemplos de residuos de aminoácido en contacto en la interfaz de la otra región constante de la cadena H incluyen regiones correspondientes a los residuos en la numeración EU posiciones 356, 439, 357, 370, 399 y 409 en la región CH3.

Más específicamente, los ejemplos incluyen un anticuerpo que comprende dos tipos de regiones CH3 de la cadena H, en donde de uno a tres pares de residuos de aminoácido en la primera región CH3 de la cadena H, seleccionados de los
5 pares de residuos de aminoácido indicados en (1) a (3) a continuación, llevan el mismo tipo de carga: (1) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las posiciones 356 y 439 de la numeración EU; (2) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las
10 posiciones 357 y 370 de la numeración EU; y (3) residuos de aminoácido comprendidos en la región CH3 de la cadena H en las posiciones 399 y 409 de la numeración EU.

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo en el que los pares de residuos de aminoácido en la segunda región
15 CH3 de la cadena H que es diferente de la primera región CH3 de la cadena H mencionada anteriormente, se seleccionen de los pares de residuos de aminoácido de (1) a (3), en donde uno a tres pares de residuos de aminoácido que corresponden a los pares de residuos de aminoácido mencionados anteriormente de
20 (1) a (3) que llevan el mismo tipo de cargas en la primera región CH3 de la cadena H mencionada anteriores llevan cargas opuestas de los residuos de aminoácido correspondientes en la primera región CH3 de la cadena H mencionada anteriormente.

Cada uno de los residuos de aminoácido indicados en
25 (1) a (3) anteriores se acercan durante la asociación. Los

expertos en la técnica pueden encontrar posiciones que correspondan a los residuos de aminoácido mencionados anteriormente de (1) a (3) en una región CH₃ de cadena H deseada o región constante de cadena H mediante modelado de homología y tal usando software disponible comercialmente, y los residuos de aminoácido de estas posiciones pueden someterse apropiadamente a modificación.

En los anticuerpos mencionados anteriormente, los "residuos de aminoácido cargados" se seleccionan preferiblemente, por ejemplo, de residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de los siguientes grupos:

- (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y
- (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

En los anticuerpos mencionados anteriormente, la frase "que llevan la misma carga" significa, por ejemplo, que todos los dos o más residuos de aminoácido se seleccionan de los residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de los grupos (a) y (b) mencionados anteriormente. La frase "que lleva cargas opuestas" significa, por ejemplo, que cuando al menos uno de los residuos de aminoácido entre dos o más residuos de aminoácido se selecciona de los residuos de aminoácido incluidos en cualquiera de los grupos (a) y (b) mencionados arriba, los residuos de aminoácido restantes se seleccionan de los residuos de aminoácido incluidos en el otro grupo.

En una modalidad preferida, los anticuerpos

mencionados anteriormente pueden tener su primera región CH3 de la cadena H y la segunda región CH3 de la cadena H entrelazadas por enlaces disulfuro.

En la presente invención, los residuos de aminoácido
5 sometidos a modificación no se limitan a los residuos de aminoácido antes mencionados de las regiones variables del anticuerpo o las regiones constantes del anticuerpo. Los expertos en la técnica pueden identificar los residuos de aminoácido que forman una interfaz en polipéptidos mutantes o
10 heteromultímeros mediante modelado de homología y tal usando software disponible comercialmente; y los residuos de aminoácido de estas posiciones pueden someterse a modificación para regular la asociación.

También pueden usarse otras técnicas conocidas para
15 la asociación de anticuerpos biespecíficos de la presente invención. Los polipéptidos que contienen la región Fc que comprenden diferentes aminoácidos se pueden asociar eficientemente entre sí sustituyendo una cadena lateral de aminoácidos presente en una de las regiones Fc de la cadena H
20 del anticuerpo con una cadena lateral más grande (botón) y sustituyendo un aminoácido cadena lateral presente en la región Fc correspondiente de la otra cadena H con una cadena lateral más pequeña (ojal) para permitir la colocación del botón dentro del ojal (documento WO 1996/027011; Ridgway JB *et al.*, Protein
25 Engineering (1996) 9, 617- 621; Merchant A. M. *et al.* Nature

Biotechnology (1998) 16, 677-681; y US20130336973).

Además, también se pueden usar otras técnicas conocidas para la formación de anticuerpos biespecíficos de la presente invención. La asociación de polipéptidos que tienen
5 diferentes secuencias se puede inducir de manera eficaz mediante la asociación complementaria de CH3 usando un dominio de ingeniería de intercambio de cadenas CH3 producido cambiando parte de uno de los CH3s de la cadena H de un anticuerpo a una secuencia derivada de IgA correspondiente e introduciendo una
10 secuencia derivada de IgA correspondiente en la porción complementaria del otro CH3 de cadena H (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010). Esta técnica conocida también puede usarse para formar eficazmente anticuerpos biespecíficos de interés.

15 Además, tecnologías para la producción de anticuerpos que usan la asociación de anticuerpos CH1 y CL y la asociación de VH y VL como las descritas en los documentos WO 2011/028952, WO2014/018572 y Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32 (2): 191-8; tecnologías para producir anticuerpos biespecíficos usando
20 anticuerpos monoclonales preparados por separado en combinación (Fab Arm Exchange) como las descritas en los documentos WO2008/119353 y WO2011/131746; tecnologías para regular la asociación entre los CH3s de cadena pesada de anticuerpos como se describe en los documentos WO2012/058768 y
25 WO2013/063702; tecnologías para producir anticuerpos

biespecíficos compuestos por dos tipos de cadenas ligeras y un tipo de cadena pesada como se describe en WO2012/023053; tecnologías para producir anticuerpos biespecíficos usando dos cepas de células bacterianas que expresan individualmente una
5 de las cadenas de un anticuerpo que comprende una sola cadena H y una sola cadena L como describen por Christoph et al. (Nature Biotechnology Vol. 31, p. 753-758 (2013)); y tales pueden usarse para la formación de anticuerpos biespecíficos.

Como alternativa, incluso cuando no se pueda formar
10 eficazmente un anticuerpo biespecífico de interés, se puede obtener un anticuerpo biespecífico de la presente invención separando y purificando el anticuerpo biespecífico de interés de los anticuerpos producidos. Por ejemplo, un método para permitir la purificación de dos tipos de formas homoméricas y
15 el anticuerpo heteromérico de interés por cromatografía de intercambio iónico al impartir una diferencia en los puntos isoelectrónicos mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en las regiones variables de los dos tipos de cadenas H se ha reportado (WO2007114325). Hasta la fecha, como
20 método para purificar anticuerpos heteroméricos, se han reportado (WO98050431 y WO95033844) métodos que usan la proteína A para purificar un anticuerpo heterodimérico que comprende una cadena H de IgG2a de ratón que se une a la proteína A y una cadena H de IgG2b de rata que no se une a la
25 proteína A. Además, un anticuerpo heterodimérico se puede

purificar de manera eficiente por sí solo mediante el uso de cadenas H que comprenden la sustitución de residuos de aminoácido en las posiciones de numeración EU 435 y 436, que es el sitio de unión de IgG-Proteína A, con Tyr, His o similares
5 que son amino ácidos que producen una afinidad de proteína A diferente, o usando cadenas H con una afinidad de proteína A diferente, para cambiar la interacción de cada una de las cadenas H con la proteína A, y luego usar una columna de proteína A.

10 Además, una región Fc cuya heterogeneidad C-terminal de la región Fc ha sido mejorada puede usarse apropiadamente como una región Fc de la presente invención. Más específicamente, la presente invención proporciona regiones Fc producidas por supresión de glicina en la posición 446 y lisina
15 en la posición 447 como se especifica mediante la numeración EU de las secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos que constituyen una región Fc derivada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

Medición de la citotoxicidad celular dependiente de células T

20 En la modalidad en donde la molécula de unión a antígeno se une tanto a CLDN6 como al complejo del receptor de células T, los métodos descritos a continuación se usan preferiblemente como un método para evaluar o determinar la citotoxicidad celular dependiente de células T (TDCC) causada
25 por el contacto de una molécula de unión a antígeno de la

presente invención con células que expresan CLDN6 a las que se une el sitio de unión a antígeno en las moléculas de unión a antígeno de la presente invención. Los métodos para evaluar o determinar la actividad citotóxica *in vitro* incluyen métodos para determinar la actividad de células T citotóxicas o similares. Si una molécula de unión a antígeno de la presente invención tiene la actividad de inducir citotoxicidad celular mediada por células T se puede determinar mediante métodos conocidos (ver, por ejemplo, Current Protocol in Immunology, Capítulo 7. Immunologic studies in humans, editor, John E, Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Inc., (1993)). En el ensayo de citotoxicidad, una molécula de unión a antígeno que es capaz de unirse a un antígeno diferente de CLDN6 y que no se expresa en las células, y el complejo receptor de células T, se usa como molécula de unión de antígeno de control. La molécula de unión a antígeno de control se analiza de la misma manera. Luego, la actividad se evalúa probando si una molécula de unión a antígeno de la presente invención exhibe una actividad citotóxica más fuerte que la de una molécula de unión a antígeno de control.

Mientras tanto, la eficacia antitumoral *in vivo* se evalúa o determina, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. Las células que expresan el antígeno al que se une el sitio de unión a antígeno en una molécula de unión a antígeno de la presente invención se trasplantan por vía

intracutánea o subcutánea a un sujeto animal no humano. Luego, desde el día del trasplante o posteriormente, se administra una molécula de unión a antígeno de prueba en una vena o cavidad peritoneal todos los días o en intervalos de varios días. El tamaño del tumor se mide a lo largo del tiempo. La diferencia en el cambio de tamaño del tumor se puede definir como actividad citotóxica. Como en un ensayo *in vitro*, se administra una molécula de unión a antígeno de control. Se puede juzgar que la molécula de unión a antígeno de la presente invención tiene actividad citotóxica cuando el tamaño del tumor es menor en el grupo administrado con la molécula de unión a antígeno de la presente invención que en el grupo administrado con la molécula de unión a antígeno de control.

Se usa preferiblemente un método MTT y la medición de la captación de timidina marcada con isótopos en las células para evaluar o determinar el efecto del contacto con una molécula de unión a antígeno de la presente invención para suprimir el crecimiento de células que expresan un antígeno al que el sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno se une. Mientras tanto, los mismos métodos descritos anteriormente para evaluar o determinar la actividad citotóxica *in vivo* pueden usarse preferiblemente para evaluar o determinar la actividad de supresión del crecimiento celular *in vivo*.

La TDCC de un anticuerpo o molécula de unión a antígeno de la invención puede evaluarse mediante cualquier

método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la TDCC se puede medir mediante un ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). En este ensayo, células objetivo (por ejemplo, células que expresan CLDN6) se incuban con células T (por ejemplo, PBMCs) en presencia de un anticuerpo de prueba o molécula de unión a antígeno, y la actividad de LDH que se ha liberado de las células objetivo muertas por células T se mide usando un reactivo adecuado. Normalmente, la actividad citotóxica se calcula como un porcentaje de la actividad de LDH resultante de la incubación con el anticuerpo o molécula de unión a antígeno en relación con la actividad de LDH resultante de la destrucción del 100% de las células objetivo (por ejemplo, lisadas mediante tratamiento con Triton-X). Si la actividad citotóxica calculada como se mencionó anteriormente es más alta, se determina que el anticuerpo de prueba o la molécula de unión a antígeno tiene una TDCC más alta.

De manera adicional o como alternativa, por ejemplo, TDCC también se puede medir mediante un ensayo de inhibición del crecimiento celular en tiempo real. En este ensayo, células objetivo (por ejemplo, células que expresan CLDN6) se incuban con células T (por ejemplo, PBMCs) en presencia de un anticuerpo de prueba o una molécula de unión a antígeno en una placa de 96 pocillos, y se controla el crecimiento de las células objetivo. por métodos conocidos en la técnica, por

ejemplo, usando un instrumento de análisis adecuado (por ejemplo, xCELLigence Real-Time Cell Analyzer). La tasa de inhibición del crecimiento celular (CGI:%) se determina a partir del valor del índice celular de acuerdo con la

5 formulación dada como $CGI (\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$. "CI_{Ab}" representa el valor del índice celular de los pocillos con el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno en un tiempo experimental específico y "CI_{NoAb}" representa el valor del índice celular promedio de los pocillos sin el anticuerpo

10 o la molécula de unión a antígeno. Si la tasa de CGI del anticuerpo o la molécula de unión a antígeno es alta, es decir, tiene un valor significativamente positivo, se puede decir que el anticuerpo o la molécula de unión a antígeno tiene actividad TDCC.

15 En un aspecto, un anticuerpo o molécula de unión a antígeno de la invención tiene actividad de activación de células T. La activación de células T se puede ensayar mediante métodos conocidos en la técnica, tal como un método que usa una línea de células T modificadas genéticamente que expresa

20 un gen informador (por ejemplo, luciferasa) en respuesta a su activación (por ejemplo, línea celular indicadora Jurkat/NFAT-RE (bioensayo de activación de células T, Promega)). En este método, células objetivo (por ejemplo, células que expresan CLDN6) se cultivan con células T en presencia de un anticuerpo

25 de prueba o una molécula de unión a antígeno, y luego se mide

el nivel o la actividad del producto de expresión del gen indicador mediante métodos apropiados como índice de activación de las células T. Cuando el gen informador es un gen de luciferasa, la luminiscencia que surge de la reacción entre luciferasa y su sustrato puede medirse como un índice de activación de células T. Si la activación de células T medida como se describe anteriormente es mayor, se determina que el anticuerpo de prueba o la molécula de unión a antígeno tiene una actividad de activación de células T más alta.

10 Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

En ciertas modalidades, cualquiera de las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos proporcionados en este documento es útil para detectar la presencia de CLDN6 en una muestra biológica. El término "detectar", tal como se usa en este documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas modalidades, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como tejidos cancerosos.

En una modalidad, se proporciona una molécula de unión a antígeno o un anticuerpo para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de CLDN6 en una muestra biológica. En ciertas modalidades, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con una molécula de unión a antígeno o anticuerpo como se describe en este documento en condiciones permisivas para la unión de la

molécula de unión de antígeno o anticuerpo a CLDN6, y detectar si se forma un complejo entre la unión de antígeno molécula o anticuerpo y CLDN6. Tal método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una modalidad, se usa una molécula de unión a antígeno o anticuerpo para seleccionar sujetos elegibles para terapia con moléculas de unión a antígeno o anticuerpos como se describe en el presente documento, por ejemplo, en donde CLDN6 es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los trastornos ejemplares que pueden diagnosticarse usando un anticuerpo de la invención incluyen cáncer, especialmente tumor de ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico y cáncer de hígado.

En determinadas modalidades, se proporcionan moléculas de unión a antígeno marcadas o anticuerpos descritos en el presente documento. Los marcadores incluyen, entre otros, marcadores o restos que se detectan directamente (tal como marcadores fluorescentes, cromofóricos, densos en electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tal como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente. por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de

luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacáridos oxidasas, por
5 ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, aquellas acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina,
10 marcadores de giro, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

Composición farmacéutica

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a
15 antígeno o el anticuerpo de la invención. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la invención induce citotoxicidad dependiente de células T, en otras palabras, la composición farmacéutica de la invención es un agente terapéutico para inducir citotoxicidad celular. En
20 determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o prevención del cáncer. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica usada para el tratamiento y/o
25 prevención del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células

no pequeñas, cáncer gástrico o cáncer de hígado. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la invención es un agente supresor del crecimiento celular. En determinadas modalidades, la composición farmacéutica de la
5 invención es un agente anticáncer.

Una composición farmacéutica de la presente invención, un agente terapéutico para inducir citotoxicidad celular, un agente supresor del crecimiento celular o un agente anticanceroso de la presente invención pueden formularse con
10 diferentes tipos de moléculas de unión a antígeno o anticuerpos, si es necesario. Por ejemplo, la acción citotóxica contra células que expresan un antígeno puede potenciarse mediante un cóctel de múltiples moléculas de unión a antígeno o anticuerpos de la invención.

15 Las composiciones farmacéuticas de una molécula de unión a antígeno o anticuerpo como se describe en el presente documento se preparan mezclando esa molécula de unión a antígeno o anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con uno o más vehículos opcionales farmacéuticamente aceptables
20 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores farmacéuticamente aceptables generalmente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se
25 limitan a: amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros

ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (tales como cloruro de octadecil dimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares en este documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasas activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasas PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX (marca registrada), Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos de sHASEGP y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las publicaciones

de patente estadounidense números 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpos liofilizados
5 ejemplares se describen en la patente estadounidense No. 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosos incluyen las descritas en la patente estadounidense No. 6,171,586 y WO2006/044908, en donde las últimas formulaciones incluyen un amortiguador acetato de histidina.

10 La formulación de la presente invención también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten adversamente entre sí. Tales ingredientes activos están
15 adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Si es necesario, las moléculas de unión a antígeno o anticuerpos de la presente invención pueden encapsularse en microcápsulas (microcápsulas hechas de hidroximetilcelulosa,
20 gelatina, metacrilato de poli[metilo] y similares), y convertirse en componentes de sistemas coloidales de administración de fármacos (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) (por ejemplo, véase "Remington's Pharmaceutical Science 16^a
25 edición", Ed. Oslo (1980)). Además, se conocen métodos para

preparar agentes como agentes de liberación sostenida, y estos se pueden aplicar a las moléculas de unión a antígeno de la presente invención (J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 267-277; Chemtech. (1982) 12, 98-105; patente estadounidense No. 5 3773719; solicitudes de patente europeas (EP) Nos. EP58481 y EP133988; Biopolymers (1983) 22, 547-556).

Las composiciones farmacéuticas, los agentes supresores del crecimiento celular o los agentes anticancerosos de la presente invención se pueden administrar por vía oral o 10 parenteral a los pacientes. Se prefiere la administración parental. Específicamente, tales métodos de administración incluyen inyección, administración nasal, administración transpulmonar y administración percutánea. Las inyecciones incluyen, por ejemplo, inyecciones intravenosas, inyecciones 15 intramusculares, inyecciones intraperitoneales e inyecciones subcutáneas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, agentes terapéuticos para inducir citotoxicidad celular, agentes supresores del crecimiento celular o agentes anticancerosos de la presente invención pueden administrarse 20 local o sistémicamente mediante inyección. Además, se pueden seleccionar métodos de administración apropiados de acuerdo con la edad y los síntomas del paciente. La dosis administrada se puede seleccionar, por ejemplo, en el intervalo de 0.0001 mg a 1000 mg por kg de peso corporal para cada administración. 25 Como alternativa, la dosis se puede seleccionar, por ejemplo,

en el intervalo de 0.001 mg/cuerpo a 100,000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, la dosis de una composición farmacéutica de la presente invención no se limita a estas dosis.

5 Preferiblemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende una molécula de unión a antígeno o un anticuerpo como se describe en el presente documento. En un aspecto, la composición es una composición farmacéutica para su uso en la inducción de citotoxicidad celular. En otro
10 aspecto, la composición es una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. Preferiblemente, el cáncer es cáncer colorrectal o cáncer gástrico. La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir el cáncer. Por lo tanto,
15 la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer, en donde la molécula de unión a antígeno o el anticuerpo como se describe en el presente documento se administra a un paciente que lo necesita.

 La presente invención también proporciona métodos
20 para dañar las células que expresan CLDN6 o para suprimir el crecimiento celular poniendo en contacto las células que expresan CLDN6 con una molécula de unión a antígeno de la presente invención que se une a CLDN6. Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLDN6 se describen anteriormente
25 como una molécula de unión a antígeno de la presente invención,

que se incluye en los agentes terapéuticos para inducir citotoxicidad celular, agentes supresores del crecimiento celular y agentes anticancerosos de la presente invención. Las células a las que se une una molécula de unión a antígeno de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que expresen CLDN6. Específicamente, en la presente invención, las células que expresan antígenos cancerosos preferidas incluyen células de cáncer de ovario, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer de útero, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de estómago, células de cáncer de vejiga urinaria y células de cáncer de colon.

En la presente invención, el "contacto" se puede llevar a cabo, por ejemplo, añadiendo una molécula de unión a antígeno de la presente invención a medios de cultivo de células que expresan CLDN6 cultivadas *in vitro*. En este caso, se puede usar una molécula de unión a antígeno a añadir en una forma apropiada, tal como una solución o un sólido preparado por liofilización o similar. Cuando la molécula de unión a antígeno de la presente invención se agrega como una solución acuosa, la solución puede ser una solución acuosa pura que contenga la molécula de unión a antígeno sola o una solución que contiene, por ejemplo, un tensioactivo, excipiente o agente colorante anteriormente descrito, agente saborizante,

conservador, estabilizador, agente amortiguador, agente de suspensión, agente isotonizante, aglutinante, desintegrador, lubricante, acelerador de fluidez y corrector. La concentración añadida no está particularmente limitada; sin embargo, la concentración final en un medio de cultivo está preferiblemente en un intervalo de 1 pg/ml a 1 g/ml, más preferiblemente de 1 ng/ml a 1 mg/ml, y aún más preferiblemente de 1 µg/ml a 1 mg/ml.

En otra modalidad de la presente invención, el "contacto" también se puede llevar a cabo mediante la administración a animales no humanos trasplantados con células que expresan CLDN6 *in vivo* o a animales que tienen células cancerosas que expresan CLDN6 de forma endógena. El método de administración puede ser oral o parenteral. Se prefiere particularmente la administración parenteral. Específicamente, el método de administración parenteral incluye inyección, administración nasal, administración pulmonar y administración percutánea. Las inyecciones incluyen, por ejemplo, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales e inyecciones subcutáneas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, los agentes terapéuticos para inducir citotoxicidad celular, agentes supresores del crecimiento celular o agentes anticancerosos de la presente invención pueden administrarse local o sistémicamente mediante inyección. Además, se puede

seleccionar un método de administración apropiado de acuerdo con la edad y los síntomas de un sujeto animal. Cuando la molécula de unión a antígeno se administra como una solución acuosa, la solución puede ser una solución acuosa pura que
5 contenga la molécula de unión a antígeno sola o una solución que contiene, por ejemplo, un tensioactivo, excipiente, agente colorante, agente saborizante, conservador, estabilizador, agente amortiguador, agente de suspensión, agente isotonizante, aglutinante, desintegrador, lubricante,
10 acelerador de fluidez y corrector. La dosis administrada se puede seleccionar, por ejemplo, en el intervalo de 0.0001 a 1000 mg por kg de peso corporal para cada administración. Como alternativa, la dosis se puede seleccionar, por ejemplo, en el intervalo de 0.001 a 100,000 mg/cuerpo para cada paciente. Sin
15 embargo, la dosis de una molécula de unión a antígeno de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

La presente invención también proporciona kits para su uso en un método de la presente invención, que contienen una molécula de unión a antígeno de la presente invención o
20 una molécula de unión a antígeno producida mediante un método de la presente invención. Los kits pueden estar envasados con un portador o medio adicional farmacéuticamente aceptable, o un manual de instrucciones que describa cómo usar los kits, etc.

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un

artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto asociado con el

5 recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución intravenosa, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma o combinada con

10 otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un ingrediente

15 activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida. Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un

20 anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente citotóxico o terapéutico adicional. El artículo manufacturado en esta modalidad de la invención puede comprender además un prospecto que indique que las

25 composiciones pueden usarse para tratar una condición

particular. Como alternativa o además, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidos otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de manufactura anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar o además de una molécula de unión a antígeno o anticuerpo.

Todos los documentos citados en este documento se incorporan aquí como referencia.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la presente invención. Se entiende que se pueden poner en práctica varias otras modalidades, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLO 1. Estabilidad de la molécula $sc(Fv)_2$

Con respecto a la estabilidad de blinatumomab, blinatumomab se purificó a 3.8 mg/mL en His 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6.0 en la empresa. Se determinó que la proporción de especies de alto peso molecular (HMW) era del 6.4% mediante

análisis SEC. A los efectos de las pruebas fisicoquímicas, se dializó frente a PBS, pH 7.4 y se ajustó la concentración a 1 mg/mL. Después de la diálisis, la proporción de HMW se cambió al 42.6%. Generalmente, la proporción de HMW de los anticuerpos IgG no cambia durante una diálisis. Por lo tanto, blinatumomab tiene una tendencia a la agregación en solución y se pensó que era menos estable en comparación con los anticuerpos IgG. El análisis SEC se llevó a cabo usando una columna SWXL G2000 (TOSOH) con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0 como amortiguador de funcionamiento. La detección se llevó a cabo mediante un detector de UV (280 nm). Los cromatogramas se analizaron usando el software Empower 3 (Waters).

EJEMPLO 2. Selección de anticuerpo de redireccionamiento de células T que se une a claudina-6 (CLDN6)

EJEMPLO 2-1. Generación de anticuerpos de redireccionamiento de células T anti-CLDN6

Para superar la limitación del formato $sc(Fv)_2$, generamos anticuerpos biespecíficos de redireccionamiento de células T dirigidos a CLDN6 (anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3) en formato IgG, que permiten que el anticuerpo obtenga una mejor estabilidad y una semivida sérica más prolongada.

Las regiones variables de tres anticuerpos anti-CLDN6 (AE3-20, AH05, CDA0013), las regiones variables de

unión a CLDN6 de 6PHU3 y las regiones variables de un anticuerpo anti-CD3 (TR01) se usaron para generar anti-CLDN6/CD3 anticuerpos biespecíficos. El CDA0013 se obtuvo a partir de células B de conejos que se inmunizaron con el

5 vector de expresión CLDN6.

Las regiones variables mencionadas anteriormente se usaron para generar anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando la técnica de intercambio de brazos Fab reportada por Igawa *et al.* (WO 2016159213). Las regiones variables

10 comprendidas en el brazo de anticuerpos anti-CLDN6/CD3 se muestran en la Tabla 1, y los anticuerpos biespecíficos generados contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma. Se generaron cuatro anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3, AE3-20/TR01, AH05/TR01,

15 CDA0013/TR01 y 6PHU3/TR01 (Tabla 1).

Tabla 1 - Anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 generados

Nombre del anticuerpo	SEC ID NO: de			
	Región variable de la cadena pesada (VH) de unión a CLDN6	Región variable de la cadena ligera (VL) de unión a CLDN6	Región variable de la cadena pesada (VH) de unión a CD3	Región variable de la cadena ligera (VL) de unión a CD3
AE3-20/TR01	1	2	70	71
AH05/TR01	89	90		
CDA0013/TR01	91	92		
6PHU3/TR01	93	94		

EJEMPLO 2-2. Actividad de activación de células T de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando el ensayo del gen indicador Jurkat

La actividad de activación de células T de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 generados en el Ejemplo 2-1, en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN9/BaF o hCLDN6 (Q156L)/BaF se examinó mediante el método descrito en el Ejemplo de referencia 3. Se determinó la actividad de activación de células T de cada anticuerpo bajo la concentración de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 nM, respectivamente.

Los resultados (figuras 1A y 1B) mostraron que todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 indujeron una fuerte activación de las células T en presencia de hCLDN6/BaF. En presencia de hCLDN9/BaF, se observó una ligera activación de células T en 6PHU3/TR01, mientras que no hubo activación en otros AE3-20/TR01, AH05/TR01 y CDA0013/TR01. Este resultado sugiere que todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 mostraron una especificidad relativamente alta hacia CLDN6, aunque 6PHU3/TR01 se une ligeramente a células que expresan CLDN9 humana.

La figura 1A y la figura 1C muestran que la activación de células T de todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 fue menor en presencia de hCLDN6 (Q156L)/BaF, en comparación con su activación de células T en presencia de hCLDN6/BaF, lo que sugiere que todos los anticuerpos

biespecíficos anti-CLDN6/CD3 se unen a epítomos que incluyen el residuo de aminoácido en la posición 156 en CLDN6 humana.

EJEMPLO 2-3. Especificidad de unión a antígeno de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 hacia las proteínas de la familia CLDN

Las células FreeStyle™ 293-F expresadas transitoriamente CLDN3, 4, 6 y 9 de ratón y humano se generaron como se indica a continuación. Se establecieron vectores de expresión de CLDN humanos y de ratón (incluidos CLDN6, CLDN9, CLDN3 y CLDN4) insertando el ADNc sintetizado que codifica para las secuencias correspondientes en el vector de expresión de mamífero pCXND3 (documento WO2008/156083).

Cada vector se introdujo en células FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) usando 293fectin (Invitrogen). Las células se cultivaron de 2 a 4 días y se recogieron mediante centrifugación. Las células recolectadas se resuspendieron inmediatamente en BSA al 0.1% que contenía D-PBS(-) en una concentración de 3×10^6 células/mL.

Anticuerpos evaluados:

1) anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3: AE3-20/TR01, AH05/TR01, CDA0013/TR01, 6PHU3/TR01;

2) anticuerpo biespecífico del anticuerpo anti-hemocianina de lapa californiana (KLH) (VH mostrado en SEC ID NO: 68, VL mostrado en SEC ID NO: 69) emparejado con anticuerpo CD3 humano (VH mostrado en SEC ID NO: 70, VL mostrado en SEC

ID NO: 71) mediante intercambio de brazo Fab: KLH/TR01 (como control negativo);

3) anticuerpos bivalentes anti-CLDN disponibles comercialmente (adquiridos en R&D systems): anticuerpo CLDN6 antihumano de ratón (MAB3656), anticuerpo CLDN3 antihumano de ratón (MAB4620), anticuerpo CLDN4 antihumano de ratón (MAB4219).

Los anticuerpos se mezclaron con células FreeStyle™ 293-F expresadas transitoriamente CLDN3, 4, 6 y 9 de ratón y humano a una concentración final de 10 µg/mL. Después de 1 hora de incubación, las células se lavaron con BSA al 0.1% que contenía D-PBS(-) y se incubaron en 5 µg/mL de anticuerpo secundario de adsorción cruzada anti-IgG humana de cabra (H+L), Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A21445) o anticuerpo secundario altamente adsorbido de forma cruzada IgG anti-ratón de cabra (H+L), Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A21236), durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron con BSA al 0.1% que contenía D-PBS(-), se resuspendieron en 5 µl de BSA al 0.1% que contenía D-PBS(-) y se analizaron mediante citómetro de flujo (iQue Screener, intellicyte).

Como se muestra en las figuras 2A y 2B, se observó una fuerte unión hacia CLDN6 humana en todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3. La unión a CLDN6 de ratón también se observó en todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3, aunque eran más débiles que la de CLDN6 humana.

Todos los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 mostraron unión leve o nula hacia CLDN9 humana, CLDN4 humana, CLDN3 humana, CLDN9 de ratón, CLDN4 de ratón o CLDN3 de ratón. Especialmente, CDA0013/TR01 mostró la mejor especificidad
5 hacia CLDN6.

EJEMPLO 2-4. Análisis de eficacia *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3

La eficacia antitumoral *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 se evaluó usando un modelo de
10 ratones portadores de tumores. Líneas celulares de cáncer humano que expresan CLDN6 humana (HuH-7 (Health Science Research Resources Bank), OV-90 (ATCC) u OVCAR-3 (ATCC)) se trasplantaron por vía subcutánea en ratones NOD/ShiJic-scid y se inyectaron PBMCs humanas en los ratones (el llamado modelo
15 de inyección de células T). Los ratones portadores de tumores se asignaron al azar a grupos de tratamiento para recibir una administración del anticuerpo o vehículo como control.

Más específicamente, la siguiente prueba se llevó a cabo en la prueba de eficacia usando el modelo de inyección de
20 células T HuH-7 u OV-90 u OVCAR-3. La expansión de las células T se llevó a cabo usando PBMCs humanas (AllCells) y un kit de activación/expansión de células T (Miltenyi Biotec). 1×10^7 células de HuH-7, 5×10^6 células de OV-90 o 1×10^7 células de OVCAR-3 y Matrigel Basement Membrane Matrix (BD) se mezclaron
25 y se trasplantaron subcutáneamente en la región lateral del

NOD/ShiJic-scid ratones (CLEA Japón, hembra, de 6 a 7 semanas de edad). El día del trasplante se definió como el día 0. Después de la aleatorización y el agrupamiento de acuerdo con el tamaño del tumor y el peso corporal, se administró por vía intraperitoneal el anticuerpo anti-asialo GM1 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) por vía intraperitoneal a 0.2 mg/ratón. Al día siguiente, se recogieron las células T del cultivo de expansión y se usaron para la implantación a 3×10^7 células/ratón por vía intraperitoneal. Aproximadamente cuatro horas después del trasplante de células T, los anticuerpos se administraron por vía intravenosa. Los anticuerpos se administraron solo una vez. Se midieron la longitud (L) y el ancho (W) de la masa tumoral y el peso corporal de cada ratón, y se calculó el volumen tumoral (TV) como: $TV = (L \times W \times W) / 2$.

Las figuras 3A y 3B muestran la eficacia antitumoral *in vivo* de AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 en modelos de inyección de células T OV-90 y HuH-7. La infusión de estos anticuerpos a 5 mg/kg retrasó fuertemente el crecimiento tumoral. Especialmente, en el modelo de inyección de células T HuH-7, AE3-20/TR01 mostró la mejor eficacia en comparación con otros dos anticuerpos, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 (figura 3A).

El análisis de toxicidad y farmacocinética (PK) de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 se llevó a cabo usando los mismos modelos de ratón. Aunque AE3-20/TR01,

AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 mostraron eficacia antitumoral en modelos de inyección de células T OV-90 y HuH-7, se observó una pérdida drástica de peso corporal en ratones tratados con AH05/TR01 y 6PHU3/TR01. No se observó ningún cambio de peso corporal en los ratones tratados con AE3-20/TR01 (figuras 4A y 4B). Además, los ratones con pérdida de peso corporal mostraron un empeoramiento del estado general y una decoloración amarilla de la piel y el plasma.

Después de la eutanasia, se extrajo plasma y se llevó a cabo una prueba bioquímica de sangre. Se determinó el nivel plasmático de marcadores de hepatotoxicidad, incluidos ALT, ALP, GGT, GLDH, TBIL y TBA (TBA-120FR, sistema médico de Canon). En ratones tratados con AH05/TR01 y 6PHU3/TR01, los parámetros hepáticos estaban significativamente elevados (figura 5). Estos datos indicaron que AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 causan hepatotoxicidad en ratones.

La PK de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 se evaluó como sigue. Se inyectaron anticuerpos por vía intravenosa en ratones a una dosis de 5 mg/kg. Se recolectó sangre de tres ratones los días 3, 7, 13 después de la inyección de anticuerpo en el modelo de inyección de células T HuH-7 y los días 3, 6, 14 después de la inyección de anticuerpo en el modelo de inyección de células T OV-90. Las muestras de plasma en heparina se obtuvieron centrifugando a 10,000 x g durante 5 minutos a 4 grados C. La concentración de los anticuerpos en

el plasma de ratón se midió mediante ELISA como se describe a continuación. Se dispensó anticuerpo anti-IgG humana (Sigma) en un Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Thermo Fisher) y se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente para preparar placas inmovilizadas con anti-IgG humana. Se usaron muestras de anticuerpos en concentraciones de 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 o 0.125 ng/mL para la calibración, y se prepararon muestras de plasma de ratón mediante dilución con 400 veces o más para su examen. Cada muestra se dispensó en las placas inmovilizadas con anti-IgG humana y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se añadió anticuerpo específico anti-Fc biotinilado (CHUGAI) para que reaccionara durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y se llevó a cabo la reacción cromogénica usando ABTS (Roche) como sustrato. Luego, se midió la absorbancia a 405 nm (650 nm como referencia) mediante un lector de microplacas. La concentración de anticuerpos en plasma de ratón se calculó a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices).

El cambio temporal de la concentración plasmática de AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 después de la administración intravenosa se muestra en la figura 6. La semivida ($T_{1/2}$) de AE3-20/TR01, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 fue de

aproximadamente 3.44 a 4.79 días en el plasma del modelo de inyección de células T HuH-7 y de aproximadamente 2.77 a 3.22 días en el modelo de inyección de células T OV-90.

Más notablemente, la semivida plasmática de 6PHU3/TR01 se prolongó a 3.44 días en el modelo HuH-7 y 2.77 días en el modelo OV-90, en comparación con las de $sc(Fv)_2$ 6PHU3 biespecíficas descritas en el informe anterior (6). Es muy probable que esta prolongación se deba a la conversión del anticuerpo del formato $sc(Fv)_2$ biespecífico al formato IgG. Sin embargo, 6PHU3/TR01 produjo hepatotoxicidad en ratones, tal como lo confirma la disminución significativa del peso corporal y el aumento de los marcadores hepáticos después de la infusión (figuras 4A, 4B y 5). Estos hallazgos sugieren que la prolongación de la semivida plasmática de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 podría provocar toxicidad hepática.

También se evaluó la eficacia y seguridad antitumorales *in vivo* de AE3-20/TR01 y CDA0013/TR01 a una dosis de 5 mg/kg usando un modelo de ratón de inyección de células T OVCAR-3. El experimento se llevó a cabo con el mismo procedimiento que se describió anteriormente.

Como se muestra en la figura 7, el tratamiento con AE3-20/TR01 condujo a una reducción significativa del volumen tumoral, mientras que el tratamiento con CDA0013/TR01 mostró una eficacia moderada en ratones portadores de OVCAR-3.

Después del tratamiento con anticuerpos, la pérdida drástica de peso corporal fue apenas detectable en su conjunto, pero se encontraron aumentos obvios en los marcadores de toxicidad hepática en el grupo de tratamiento con CDA0013/TR01 (figura 8). De hecho, uno de cada cinco ratones en el grupo de tratamiento CDA0013/TR01 mostró una reducción de peso corporal débil.

Se calculó la PK de AE3-20/TR01 y CDA0013/TR01 usando animales con inyección intravenosa a 5 mg/kg de la siguiente manera. Las muestras de plasma en heparina se prepararon a partir de sangre extraída de tres animales los días 3, 7, 14 después de la inyección, luego se sometieron a medición de la concentración de anticuerpos por ELISA como se describió previamente en este Ejemplo.

Como se muestra en la figura 9, la característica PK de AE3-20/TR01 y CDA0013/TR01 fue comparable. La semivida plasmática ($T_{1/2}$) de AE3-20/TR01 y CDA0013/TR01 fue de 3.60 y 3.98 días y el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de cero a infinito (AUC_{inf}) fue de 138 y 161 días* μ g/mL, respectivamente.

De acuerdo con el resultado de este ejemplo, algunos anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en formato IgG tienden a tener el potencial de causar daño hepático, aunque todos los anticuerpos mostraron una especificidad relativamente alta hacia CLDN6 y un perfil farmacocinético

similar. Entre los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 probados, se encontró que AE3-20/TR01 era el único anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3 que mostró tanto eficacia como buen perfil de seguridad en varios modelos de ratón portadores de tumores.

EJEMPLO 3. Humanización de regiones variables de unión a CLDN6 para anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3

Aunque AE3-20/TR01 mostró eficacia y buen perfil de seguridad en varios modelos de ratón portadores de tumores, las regiones variables de unión a CLDN6 de AE3-20/TR01 son secuencias de ratón, no es aplicable para la administración de este anticuerpo a pacientes debido a su alta inmunogenicidad. Se llevó a cabo la humanización de las regiones variables de unión a CLDN6 de AE3-20/TR01. Las regiones variables de unión a CD3 de AE3-20/TR01 son secuencias humanizadas.

Los residuos de aminoácido del VH de unión a CLDN6 de AE3-20/TR01 (AE3.20H, SEC ID NO: 1) y el VL de unión a CLDN6 de AE3-20/TR01 (AE3.20L, SEC ID NO: 2) están numerados de acuerdo con Kabat (Kabat *et al.*, Sequence of proteins of immunological interest, 5^a edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)).

Se diseñaron 49 tipos de VHs sustituyendo las estructuras de AE3.20H con estructuras de la línea germinal humana (SEC ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 como FR1, SEC ID NO: 10 como FR2, SEC ID NO: 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 como FR3,

SEC ID NO: 18 como FR4). Se diseñaron 16 tipos de VLs sustituyendo los marcos de AE3.20L con marcos de la línea germinal humana (SEC ID NO: 19, 20, 21 o 22 como FR1, SEC ID NO: 23 como FR2, SEC ID NO: 24, 25, 26, o 27 como FR3, SEC ID NO: 28 como FR4). Los polinucleótidos que codifican para AE3.20H y los VHs diseñados se clonaron en vectores de expresión que contenían polinucleótidos que codificaban para la región constante de cadena pesada SG1 (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID NO: 80), respectivamente. Los polinucleótidos que codifican para AE3.20L y las VLs diseñadas se clonaron en vectores de expresión que contenían polinucleótidos que codificaban para la región constante SK1 de cadena ligera (la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID NO: 81), respectivamente. Las cadenas pesadas que comprenden AE3.20H y los VHs diseñados se expresaron transitoriamente con la cadena ligera que comprende AE3.20L respectivamente, y las cadenas ligeras que comprenden los VLs diseñados se expresaron transitoriamente con la cadena pesada que comprende AE3.20H respectivamente, en células Expi 293.

La unión de los anticuerpos que comprenden VH y AE3.20L diseñados y los anticuerpos que comprenden VL y AE3.20H diseñados a hCLDN6/BaF se determinó mediante análisis FCM. Las actividades de unión de cada anticuerpo están representadas por los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI).

Los anticuerpos se incubaron con hCLDN6/BaF durante 30 minutos

a 4 grados C y se lavaron con amortiguador de lavado HEPES-BSA (Nacalai Tesque, Cat. L3P8406). A continuación, se añadió anticuerpo secundario anti-IgG humana F(ab')₂ de cabra, ads-PE de ratón (Southern Biotech, Cat. 2043-09) y se incubó durante 5 30 minutos en la oscuridad a 4 grados C y posteriormente se lavó. La adquisición de datos se llevó a cabo usando LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

Entre los 49 tipos de VHs diseñados, solo dos tipos 10 de VH (mostrados en la Tabla 2) pudieron mejorar la actividad de unión del anticuerpo hacia CLDN6 humana, en comparación con los anticuerpos que comprenden AE3.20H. Ninguno de los 16 tipos de VLs diseñados que se mostraron contribuyó a la actividad de unión del anticuerpo hacia CLDN6 humana tanto como 15 AE3.20L. Parece ser difícil humanizar AE3.20L sin comprometer la actividad de unión a CLDN6 del anticuerpo.

Tabla 2

Nombre de VH	CDRs	SEC ID NO: de			
		FR1	FR2	FR3	FR4
22H	Igual que aquellas de AE3.20H	3	10	14	18
25H		6	10	14	18

Para lograr suficiente actividad de unión hacia CLDN6 humana, se diseñaron racionalmente los VLs de unión a CLDN6 (se seleccionaron secuencias marco de la línea germinal humana 25 que son similares al marco correspondiente de AE3.20L, y

también se intentó la introducción de mutaciones inversas en marcos). Los VLs diseñados (17L, 18L, 19L y 20L) tienen las mismas secuencias de CDR que AE3.20L, y las secuencias de sus marcos se muestran en la Tabla 3. Se adoptaron mutaciones
5 inversas en los marcos de 18L, 19L y 20L, que son también se muestra en la Tabla 3. Los anticuerpos IgG bivalentes que comprenden VH 25H y VLs seleccionados de 17L, 18L, 19L y 20L se expresaron transitoriamente en células Expi 293. La figura 10 muestra la unión de varios anticuerpos hacia hCLDN6/BaF
10 determinada por análisis FCM. Las actividades de unión de cada anticuerpo están representadas por el MFI. Los nombres en el eje horizontal en la figura 10 muestran el VH y VL comprendidos en cada anticuerpo.

Todos los anticuerpos que comprenden VL diseñado
15 (17L, 18L, 19L y 20L) mostraron una actividad de unión más débil hacia CLDN6 humana que el anticuerpo que comprende AE3.20L como VL, lo que también indicó la dificultad de humanizar AE3.20L sin comprometer la actividad de unión a CLDN6. Sin embargo, el anticuerpo comprende 20L, que alberga
20 la mutación G66R, mostró una actividad de unión más fuerte a CLDN6 humana en comparación con el anticuerpo que comprende 17L, que no alberga la mutación G66R, lo que sugiere que la sustitución de Gly en la posición 66 del aminoácido por Arg en los marcos de cadena ligera ayudarían a mejorar la actividad
25 de unión del anticuerpo a CLDN6 humana.

Tabla 3

Nombre de VL	CDRs	SEC ID NO: de				Sustitución de aminoácido comparada con 17L (retro mutación)
		FR1	FR2	FR3	FR4	
17L	Igual que aquellas de AE3.20L	19	23	24	29	-
18L		19	30	24	29	K45Q
19L		19	31	24	29	A43S, K45Q
20L		19	23	32	29	G66R

EJEMPLO 4. Maduración por afinidad del anticuerpo humanizado anti-CLDN6

Para mejorar la afinidad de unión de las regiones variables de unión de CLDN6 humanizadas, se introdujeron mutaciones únicas o múltiples exhaustivas en las CDRs de AE3.20H y AE3.20L, y la SEC ID NO: 6 se usó como FR1 de cadena pesada, SEC ID NO: 10 se usó como FR2 de cadena pesada, SEC ID NO: 14 se usó como FR3 de cadena pesada, SEC ID NO: 18 se usó como FR4 de cadena pesada, SEC ID NO: 22 o 19 se usó como FR1 de cadena ligera, SEC ID NO: 23 se usó como cadena ligera FR2, SEC ID NO: 24 o 32 se usó como cadena ligera FR3, SEC ID NO: 28 o 29 se usó como cadena ligera FR4, para preparar diversas variantes de anticuerpos. Las variantes de anticuerpos se expresaron con Expi293 (Invitrogen) y se purificaron mediante purificación de Proteína A.

Comprobando la actividad de unión de CLDN6 de las variantes de anticuerpos, se sugirió que las sustituciones de aminoácidos mostradas en la Tabla 4 y la Tabla 5 podrían ser

útiles para mejorar la actividad de unión hacia CLDN6 humana.

Tabla 4

	Nombre de VH	Sustitución de aminoácidos en CDRs comparada con AE3.20H	Marcos	SEC ID NO
5	25H0021	Y32L	Igual con aquellos de 25H	35
	25H0024	Y32V		36
	25H0042	T33V		37
	25H0176	G53K		38
	25H0322	D61F		39
	25H0562	Y102M		40
10	25H0581	Y32L, D61F		34

Tabla 5

	Nombre de VL	Sustitución de aminoácidos en CDRs comparada con AE3.20L	Marcos	SEC ID NO:
	20L0072	E27Y	Igual con aquellos de 20L	42
15	20L0532	E27Y, A50Y		43

Los VHs descritos en la Tabla 4 y los VLs descritos en la Tabla 5, junto con una región variable que muestra actividad de unión hacia CD3 humano (VH SEC ID NO: 70; VL SEC ID NO: 71) se usaron para generar anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando la técnica de intercambio de brazos Fab informada por Igawa *et al.* (WO 2016159213). Las regiones variables comprendidas en el brazo de anticuerpos anti-CLDN6/CD3 se muestran en la Tabla 6, y los anticuerpos biespecíficos generados contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma.

Tabla 6

	Nombre de anticuerpo	VH de unión a CLDN6		VL de unión a CLDN6		VH de unión a CD3	VL de unión a CD3
		SEC ID NO	Nombre	SEC ID NO	Nombre		
5	25H0021/20L0072//TR01	35	25H0021	42	20L0072	SEC ID NO: 70	SEC ID NO: 71
	25H0024/20L0072//TR01	36	25H0024	42	20L0072		
	25H0042/20L0072//TR01	37	25H0042	42	20L0072		
	25H0176/20L0072//TR01	38	25H0176	42	20L0072		
	25H0322/20L0072//TR01	39	25H0322	42	20L0072		
10	25H0562/20L0072//TR01	40	25H0562	42	20L0072		
	25H0581/20L0072//TR01	34	25H0581	42	20L0072		
	25H/20L0532//TR01	33	25H	43	20L0532		
	25H0021/20L0532//TR01	35	25H0021	43	20L0532		
	25H0024/20L0532//TR01	36	25H0024	43	20L0532		
15	25H0042/20L0532//TR01	37	25H0042	43	20L0532		
	25H0176/20L0532//TR01	38	25H0176	43	20L0532		
	25H0322/20L0532//TR01	39	25H0322	43	20L0532		
	25H0562/20L0532//TR01	40	25H0562	43	20L0532		
	25H0581/20L0532//TR01	34	25H0581	43	20L0532		
	AE3-20/TR01	1	AE3.20H	2	AE3.20L		

La figura 11 muestra la actividad de activación de células T de 10 nM de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 como se muestra en la Tabla 6 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinada por el método descrito en Ejemplo de referencia 3. Se usó KLH/TR01 generado en el Ejemplo 2-3 como control negativo.

Algunos de los anticuerpos biespecíficos, tal como 25H0322/20L0072//TR01 y 25H0562/20L0072//TR01 mostraron una

menor actividad de activación de células T en presencia de hCLDN6/BaF en comparación con AE3-20/TR01.

Algunos de los anticuerpos biespecíficos, tal como 25H0581/20L0072//TR01 y 25H0581/20L0532//TR01 mostraron una
 5 mayor actividad de activación de células T en presencia de hCLDN9/BaF y hCLDN4/BaF en comparación con AE3-20/TR01.

Pero varios anticuerpos biespecíficos mostraron una actividad de activación de células T similar comparable en presencia de hCLDN6/BaF sin mostrar una mayor activación de
 10 células T en presencia de hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF en comparación con AE3-20/TR01.

La ECM (matriz extracelular) es un componente extracelular y reside en varios sitios *in vivo*. Por lo tanto, se sabe que un anticuerpo que se une fuertemente a ECM tiene
 15 una cinética más pobre (semivida más corta) en sangre (WO2012093704 A1).

Se evaluó la unión a ECM del anticuerpo IgG bivalente que comprende el VH y VL mostrado en la Tabla 7. El valor de unión a ECM (reacción ECL) de cada anticuerpo se dividió por
 20 el valor de unión a ECM del anticuerpo MRA (VH: SEC ID NO: 66, VL: SEC ID NO: 67) obtenido en la misma placa o en la misma fecha de ejecución, y el valor resultante se muestra en la Tabla 7. Como se muestra en la Tabla 7, la unión a ECM de los anticuerpos varía enormemente.

Tabla 7- Resultados de unión a ECM

5	Nombre del anticuerpo	Luminiscencia	Relación de Luminiscencia vs MRA	SEC ID NO: de			
				VH	VL	CH	CL
	MRA (control negativo)	13043.5	1.00	66	67	80	81
	25H0021/20L0072	32891.5	2.52	35	42		
	25H0024/20L0072	29640.5	2.27	36			
	25H0042/20L0072	40377.5	3.10	37			
	25H0176/20L0072	77022	5.91	38			
	25H0322/20L0072	70573.5	5.41	39			
	25H0562/20L0072	32630.5	2.50	40			

Los resultados de los experimentos mencionados anteriormente indicaron que es muy difícil tener todas las propiedades preferibles, incluida una alta actividad de unión hacia CLDN6, alta especificidad de unión hacia CLDN6 (baja actividad de unión hacia CLDN3, CLDN4 y CLDN9), y baja unión de ECM en el mismo tiempo. Por ejemplo, aunque sólo hay pocas diferencias de aminoácidos en los anticuerpos comparados entre sí, los anticuerpos que comprenden 25H0322 o 25H0562 como VH mostraron una actividad de unión hacia CLDN6 más pobre en comparación con los que comprenden AE3.20H como VH; los anticuerpos que comprenden 25H0581 como VH mostraron una escasa especificidad de unión hacia CLDN6; los anticuerpos que comprenden 25H0176 o 25H0322 como VH no eran las variantes más preferibles desde la perspectiva de la unión a ECM.

Teniendo en cuenta la actividad de unión y la especificidad hacia CLDN6 humana, junto con la unión de ECM, el anticuerpo comprende 25H o 25H0042 como VH, 20L0532 como VL

se usó para ingeniería adicional.

EJEMPLO 5. Optimización de anticuerpos

Los anticuerpos biespecíficos fabricados mediante la tecnología de intercambio de brazos Fab no son adecuados para el proceso de purificación y producción para proporcionar el compuesto a gran escala. Para mejorar la capacidad de manufactura del anticuerpo biespecífico, se llevó a cabo una optimización adicional como sigue.

EJEMPLO 5-1. Eliminación de puntos críticos de degradación

Para evitar degradaciones químicas tales como ciclación, isomerización, escisión y oxidación de metionina, en otras palabras, para mejorar la estabilidad del anticuerpo, se sustituyeron algunos residuos de aminoácido en la secuencia correspondiente dentro de las CDRs. También se introdujeron en las CDRs sustituciones de aminoácidos que se encontró que mejoraban aún más la afinidad de unión y la especificidad de las regiones variables de unión de CLDN6.

El nombre de las sustituciones de aminoácidos y VH en comparación con 25H0042 se muestra en la Tabla 8. El nombre de las sustituciones de aminoácidos y VL en comparación con 20L0532 se muestra en la Tabla 9. El VH descrito en la Tabla 8 y el VL descrito en la Tabla 9, junto con una región variable muestra actividad de unión hacia CD3 humano (VH SEC ID NO: 70; VL SEC ID NO: 71) se usaron para generar anticuerpos

biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando la técnica de intercambio de brazos Fab informada por Igawa *et al.* (WO2016159213). Las regiones variables comprendidas en el brazo de anticuerpos anti-CLDN6/CD3 se muestran en la Tabla 10, y los anticuerpos 5 biespecíficos generados contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma.

Tabla 8

Nombre de VH	Sustituciones de aminoácido en CDRs comparadas con 25H0042	SEC ID NO
25H0671	M34G, G54V, S62V, Y97F	45

10

Tabla 9

Nombre de VL	Sustituciones de aminoácido en CDRs comparadas con 20L0532	SEC ID NO
20L0571	S31L, Y50L, D56I	46

Tabla 10

15

Nombre de anticuerpo	VH de unión a CLDN6	VL de unión a CLDN6	VH de unión a CD3	VL de unión a CD3
25H0671/20L0571//TR01	25H0671	20L0571	SEC ID NO: 70	SEC ID NO: 71
AE3-20/TR01	AE3.20H	AE3.20L		
CS2201	25H	20L0532		

20

25

La figura 12 mostró la actividad de activación de células T de 10 nM de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinada por el método descrito en el Ejemplo de referencia 3. 25H0671/20L0571//TR01 indujo una activación de células T comparable en presencia de hCLDN6/BaF en comparación con CS2201, sin mostrar una mayor activación de células T en

presencia de hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF en comparación con CS2201.

EJEMPLO 5-2. Ingeniería de pI

En la preparación de un anticuerpo biespecífico, cuando se usan dos tipos de cadenas pesadas y dos tipos de cadenas ligeras para la expresión, teóricamente se expresan diez tipos de combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Para permitir una fácil purificación del anticuerpo biespecífico de interés separando estos diez tipos de anticuerpos, se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos para disminuir el punto isoeléctrico (pI) del CLDN6 que une VH y VL.

Para evaluar el efecto de reducción de pI de varias sustituciones de aminoácidos, se introdujeron sustituciones de aminoácidos en el VH 25H0671 y el VL 20L0571, para reducir la cantidad de aminoácidos cargados positivamente (tal como arginina y lisina) mientras se aumentaban los aminoácidos cargados negativamente (tal como ácido aspártico y ácido glutámico).

La Tabla 11 muestra las variantes de VH diseñadas por pI, y la Tabla 12 muestra las variantes de VL diseñadas por pI.

Tabla 11

Nombre de VH	Sustituciones de aminoácido en FR comparadas con 5H0671	SEC ID NO
57H0671	R16D, Q43E, N73D	47
65H0671	R16G, A84D, Q105E	50

Tabla 12

Nombre de VL	Sustituciones de aminoácido en FR comparadas con 0L0571	SEC ID NO
53L0571	K45E, S60D	53
54L0571	K45E, S60D, L104V, K107E	54

5 Se usaron anticuerpos IgG bivalentes que comprenden VH seleccionado de la Tabla 11 y VL seleccionado de la Tabla 12 para el cálculo del pI teórico. Los anticuerpos IgG bivalentes producidos comprenden las mismas regiones constantes de IgG. El pI teórico de los anticuerpos se calculó
10 usando GENETYX-SV/RC Ver 14.0.0 (GENETYX CORPORATION) mediante un método similar al descrito anteriormente.

Los valores de pI teóricos calculados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 - pI teórico

15	Nombre del anticuerpo	VH	VL	pI teórico
	25H0671/20L0571_bivalent	25H0671	20L0571	8.04
	57H0671/20L0571_bivalent	57H0671	20L0571	7.54
	65H0671/20L0571_bivalent	65H0671	20L0571	7.69
	25H0671/53L0571_bivalent	25H0671	53L0571	7.69
	25H0671/54L0571_bivalent	25H0671	54L0571	7.37
20	65H0671/53L0571_bivalent	65H0671	53L0571	7.19
	65H0671/54L0571_bivalent	65H0671	54L0571	6.83

Las regiones variables de unión a CLDN6 descritas en la Tabla 14, junto con las regiones variables que muestran actividad de unión hacia CD3 humano (VH SEC ID NO: 70; VL SEC
25 ID NO: 71) se usaron para generar anticuerpos biespecíficos

anti-CLDN6/CD3 usando el brazo Fab técnica de intercambio informada por Igawa *et al.* (WO2016159213). Los anticuerpos biespecíficos generados contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma.

5

Tabla 14

10

Nombre del anticuerpo	VH de unión a CLDN6	VL de unión a CLDN6	VH de unión a CD3	VL de unión a CD3
AE3-20/TR01	AE3.20H	AE3.20L	SEC ID NO: 70	SEC ID NO: 71
57H0671/20L0571//TR01	57H0671	20L0571		
65H0671/20L0571//TR01	65H0671	20L0571		
25H0671/20L0571//TR01	25H0671	20L0571		
25H0671/53L0571//TR01	25H0671	53L0571		
25H0671/54L0571//TR01	25H0671	54L0571		

15

La figura 13 muestra la actividad de activación de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 con ingeniería de pI en VH de unión a CLDN6 (57H0671/20L0571//TR01 y 65H0671/20L0571//TR01) en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinados por el método descrito en el Ejemplo de referencia 3.

20

De acuerdo con el pI teórico, la actividad de activación de las células T y las secuencias de los marcos, se seleccionaron los marcos de 65H0671 para una evaluación adicional.

25

La figura 14 muestra la actividad de activación de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 con ingeniería pI en VL de unión a CLDN6 (25H0671/53L0571//TR01 y 25H0671/54L0571//TR01) en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF,

hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinados por el método descrito en el Ejemplo de referencia 3.

De acuerdo con la actividad teórica de activación de células T y pI, se seleccionaron los marcos de 54L0571 para una evaluación adicional.

Las regiones variables de unión a CLDN6 descritas en la Tabla 15, junto con las regiones variables que muestran actividad de unión hacia CD3 humano (VH SEC ID NO: 70; VL SEC ID NO: 71) se usaron para generar anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando el brazo Fab técnica de intercambio informada por Igawa *et al.* (WO2016159213). Los anticuerpos biespecíficos generados contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma.

Tabla 15

Nombre de anticuerpo	VH de unión a CLDN6	VL de unión a CLDN6
65H0671/54L0571//TR01	65H0671	54L0571
25H0671/20L0571//TR01	25H0671	20L0571

La figura 15 muestra la actividad de activación de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 con ingeniería de pI tanto en VH de unión a CLDN6 como en VL de unión a CLDN6 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinado mediante el método descrito en el Ejemplo de referencia 3. El resultado indicó que la actividad de unión y la especificidad de unión hacia CLDN6 humana de 65H0671/54L0571//TR01 es comparable con la de

25H0671/20L0571//TR01.

Los valores de pI de los anticuerpos que comprenden los marcos seleccionados también se determinaron realmente usando el Maurice (ProteinSimple) con el cartucho cIEF (PS-MC02-C). La región constante en los anticuerpos fue la misma que la que se muestra en la Tabla 13. La carga de la muestra se llevó a cabo durante 55 s. Posteriormente, se llevó a cabo el enfoque a 1500 V durante 1 min y 3000 V durante 6 min. Detección de emisión fluorescente a 330 nm y excitación de 280 nm en combinación con la absorbancia UV estándar a 280 nm. El tiempo de exposición fluorescente fue de 3 segundos, 5 segundos, 10 segundos y 20 segundos. Para el anolito, se usaron ácido fosfórico 80 mM en metilcelulosa al 0.1%, y para el catolito, hidróxido de sodio 100 mM en metilcelulosa al 0.1%. Cada solución de muestra contenía cantidades constantes de muestra de 0.017 mg/mL, Pharmalyte 3-10 al 5%, metilcelulosa al 0.42%, urea 3.6 M, Arg 10 mM, marcador pI al 1% 4.05 y marcador pI al 1% 9.99. Se usó el software asociado Compass para iCE (2.0.10) para el análisis de datos.

20

Tabla 16

Nombre del anticuerpo	pI
25H0671/20L0571_bivalent	9.12
65H0671/54L0571_bivalent	7.49

25

Como se muestra en la Tabla 16, el pI medido de

65H0671/54L0571_bivalente fue de 7.49, que fue menor que el pI de 25H0671/20L0571_bivalente, el anticuerpo sin ninguna modificación de aminoácidos de ingeniería de pI.

EJEMPLO 5-3. Control del emparejamiento de cadenas

5 pesadas y cadenas ligeras

En la preparación de un anticuerpo biespecífico, cuando se usan dos tipos de cadenas pesadas y dos tipos de cadenas ligeras para la expresión, teóricamente se expresan diez tipos de combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Dado que solo una de estas combinaciones es el anticuerpo biespecífico de interés, la obtención de un anticuerpo biespecífico de interés requiere purificar un anticuerpo de interés de la mezcla de 10 anticuerpos diferentes, lo cual es muy ineficaz y difícil. Como medio para resolver este problema, se introdujeron modificaciones de "Botón" y "Ojal" (KiH: Botones en Ojal) en el dominio CH3 de las cadenas H de IgG de tal manera que la IgG con dos cadenas H diferentes combinadas se secreta preferentemente y, para mayor eficiencia obtener una molécula de interés, sustituciones de aminoácidos y combinaciones de las mismas en las regiones variables y la interfaz del dominio CH1-CL para promover la asociación deseada cadena H-cadena L (Referencia WO2013065708).

La sustitución de aminoácidos Q39K se introdujo en la VH de unión a CD3 mostrada en SEC ID NO: 70, y la sustitución

de aminoácidos Q38E se introdujo en la VL de unión a CD3 mostrada en SEC ID NO: 71. Las secuencias de unión a CD3 sustituidas con aminoácidos VH y VL se muestran en SEC ID NO: 60 y SEC ID NO: 61, respectivamente.

5 La sustitución de aminoácidos Q39E se introdujo en el VH 65H0671 de unión a CLDN6, y la sustitución de aminoácidos Q38K se introdujo en el VL 54L0571 de unión a CLDN6. Los aminoácidos sustituidos CLDN6 que se unen a VH y VL se denominaron 65H0671Q39E (SEC ID NO: 57) y 54L0571Q38K (SEC ID
10 NO: 58) respectivamente.

El VH 65H0671Q39E de unión a CLDN6 se unió a una primera región de dominio CH1 que se muestra en SEC ID NO: 95, el VL 54L0571Q38K de unión a CLDN6 se unió a un primer dominio CL mostrado en SEC ID NO: 59 para hacer una primera cadena
15 ligera mostrada en SEC ID NO: 96. El VH de unión a CD3 mostrado en SEC ID NO: 60 se unió a un segundo dominio CH1 mostrado en SEC ID NO: 97, el VL de unión a CD3 mostrado en SEC ID NO: 61 se unió a un segundo dominio CL mostrado en SEC ID NO: 62 para hacer una segunda cadena ligera mostrada en SEC ID NO: 98. Los
20 dominios CH1 y los dominios CL también contienen sustituciones de aminoácidos en comparación con las naturales, que son: Glu (E) en la posición 147, 175 y 213 en el primer dominio CH1; Lys (K) en la posición 123, 131, 160 y 180 en el primer dominio CL; Lys (K) en la posición del aminoácido 175 en el segundo
25 dominio CH1; y Glu (E) en la posición de aminoácidos 131, 160

y 180 en el segundo dominio CL. El primer dominio CH1 se unió además a una primera región bisagra-CH2-CH3 para hacer una primera cadena pesada que se muestra en SEC ID NO: 99, el segundo dominio CH1 se unió más a una segunda región bisagra-CH2-CH3 para hacer una segunda cadena pesada mostrada en SEC ID NO: 100. Como resultado, se generó el anticuerpo CS2425 (primera cadena pesada SEC ID NO: 99, primera cadena ligera SEC ID NO: 96, segunda cadena pesada SEC ID NO: 100, segunda cadena ligera SEC ID NO: 98).

La heterogeneidad de carga de CS2425 se evaluó usando Maurice (ProteinSimple) con el cartucho cIEF (PS-MC02-C). La carga de la muestra se llevó a cabo durante 55 s. Posteriormente, se llevó a cabo el enfoque a 1500 V durante 1 min y 3000 V durante 6 min. La detección fue la absorbancia UV a 280 nm. Para el anolito, se usaron ácido fosfórico 80 mM en metilcelulosa al 0.1%, y para el catolito, hidróxido de sodio 100 mM en metilcelulosa al 0.1%. Cada solución de muestra contenía cantidades constantes de muestra de 0.085 mg/mL, Pharmalyte 5-8 al 2%, Pharmalyte 8-10.5 al 2%, metilcelulosa al 0.42%, urea 3.6 M, Arg 10 mM, marcador pI al 1% 5,85 y marcador pI al 1% 10.17. Se usó el software asociado Compass para iCE (2.0.10) para el análisis de datos.

La figura 16A mostró la heterogeneidad de carga de CS2425 (65H0671Q39E-SG1189v14k/54L0571Q38K-SK1018//TR01H(Q39K)-SG1191v14h/TR01L(Q38E)-SK1017) cuando la

primera cadena pesada, la primera cadena ligera, la segunda pesada cadena, y la segunda cadena ligera hechas anteriormente se expresaron juntas. El electroferograma sugirió que ambas mutaciones tenían un buen control de HH y HL, porque no había
5 otros picos obvios aparte del pico principal alrededor de pI 9.0.

EJEMPLO 5-4. Análisis de seguridad y eficacia antitumoral de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3

La eficacia antitumoral *in vivo* del anticuerpo
10 biespecífico CS2201 anti-CLDN6/CD3 preparado en el Ejemplo 5-1 se determinó usando un modelo de inyección de células T OV-90. Se usó AE3-20/TR01 como comparación. En ratones tratados con anticuerpos biespecíficos a 0.1 mg/kg, CS2201 fue más eficaz que AE3-20/TR01 contra el modelo de inyección de células
15 T OV-90 (figura 17). Por otro lado, CS2201 y AE3-20/TR01 mostraron una eficacia antitumoral comparable a 5 mg/kg (figura 18). Con respecto a la hepatotoxicidad de CS2201, no se observó ninguna anomalía del marcador hepatotóxico a partir del resultado del análisis de sangre (figura 19). Además, se
20 encontró que la característica PK de CS2201 y AE3-20/TR01 era comparable (figura 20). La semivida plasmática ($T_{1/2}$) de CS2201 y AE3-20/TR01 fue de 3.64 y 3.48 días en el grupo de 0.1 mg/kg, respectivamente. El área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de cero a infinito (AUC_{inf}) de CS2201 y AE3-
25 20/TR01 fueron 1.83 y 2.35 días* μ g/mL en el grupo de 0.1 mg/kg,

respectivamente.

La eficacia antitumoral y la toxicidad del anticuerpo biespecífico CS2425 anti-CLDN6/CD3 se examinaron usando un modelo de inyección de células T OV-90. Los ratones inoculados
5 con células OV-90 se trataron con 0.1 mg/kg o 5 mg/kg de CS2425 y se examinaron el volumen del tumor y el peso corporal.

Se observó una regresión tumoral significativa en ratones que recibieron CS2425 a 0.1 mg/kg. En este grupo de tratamiento, no se observó ningún signo tóxico con base en
10 el resultado del cambio de peso corporal y el estado general del ratón después de la administración de anticuerpos (figura 21A). Sin embargo, el ratón tratado con CS2425 a 5 mg/kg mostró una pérdida de peso corporal significativa (figura 21B). De acuerdo con el cambio severo del peso corporal, los
15 marcadores sanguíneos de daño hepático se elevaron drásticamente en todos los animales que recibieron 5 mg/kg de CS2425 (figura 22).

También se calcularon los niveles circulantes de CS2425. Las muestras de plasma preparadas a partir de tres
20 animales el día 4, 13 después de la inyección para el grupo de 0.1 mg/kg y el día 4, 6 después de la inyección para el grupo de 5 mg/kg se usaron para el análisis de PK como se describe en el EJEMPLO 2-4. La figura 23 representa el curso temporal de la concentración plasmática de CS2425 después de la
25 administración.

EJEMPLO 6: Reingeniería de las regiones variables de unión de CLDN6

EJEMPLO 6-1: Estudios de inmunogenicidad *in vitro* usando PBMCs humanas y reelección del emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras que controlan las sustituciones de aminoácidos

Se generaron los anticuerpos IgG bivalentes que se muestran en la Tabla 17. Se sabía que el anticuerpo A tenía baja inmunogenicidad y se usó como control negativo en el estudio de inmunogenicidad. El anticuerpo anti-hA33, que se sabía que tenía una alta inmunogenicidad, se usó como control positivo en el estudio de inmunogenicidad.

Tabla 17

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera
CS2419	SEC ID NO: 101 (que comprende VH de unión a CLDN6 igual que con aquella de CS2425)	cadena ligera de anticuerpo-A
CS2421	cadena pesada de anticuerpo-A	Cadena ligera de unión a CLDN6 de CS2425, mostrada en SEC ID NO: 96

El potencial inmunogénico de los anticuerpos se evaluó usando como indicador la proporción de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 antes de que se exhiba la proliferación activa como se describe en el documento WO/2018/124005 (Kubo C. et al). Específicamente, se prepararon PBMCs CD8-CD25^{low} a partir de PBMCs humanas y las células se cultivaron durante 67 horas en presencia de los anticuerpos. La figura 24 muestra

los resultados de la determinación de las proporciones de células secretoras de IL-2 en las poblaciones de células cultivadas. Como se muestra en la figura 24, la frecuencia de donantes positivos para CS2419 fue baja en comparación con la del anticuerpo-A. Por otro lado, la frecuencia de donantes positivos para CS2421 fue similar a la del anticuerpo anti-hA33. Por lo tanto, usando la proporción de células T CD4⁺ secretoras de IL-2 como indicador, se consideró que CS2419 no tenía un alto potencial inmunogénico, pero CS2421 un anticuerpo recombinado que tenía un alto potencial inmunogénico. A partir de los resultados, se consideró que la cadena ligera de unión a CLDN6 de CS2425, que se muestra en la SEC ID NO: 96, implicaba epítomos de células T potenciales.

Para identificar un epítopo potencial de células T de la cadena ligera de unión a CLDN6 de CS2425, se llevó a cabo proteómica peptídica asociada a MHC (MAPP) con CS2425, tal como se describe en US20050202009A1 (Kropshofer H. et al) y mAbs 2018; 10: 1168 - 81 (Sekiguchi N. et al). Se prepararon monocitos a partir de PBMCs humanas y las células se diferenciaron en células dendríticas (DC). Las DCs se pulsaron con anticuerpos en presencia de LPS y se lisaron en detergente TX-100. Los complejos péptido-MHC II se obtuvieron a partir de DCs lisadas usando perlas magnéticas acopladas con el anticuerpo anti-HLA-DR en el proceso de inmunoprecipitación, y los péptidos asociados con HLA-DR eluidos con TFA al 0.1% se

analizaron mediante tecnología LC/Orbitrap MS/MS. Los mapas de calor de MAPP en una parte de la cadena ligera de CS2425 se muestran en la figura 25. Como se muestra en la figura 25, muchos péptidos se identificaron como epítomos potenciales de células T en una región (Secuencia No. 167 ~ 184) de la CLDN6. la cadena ligera de unión de CS2425, que contiene Lys en la posición de aminoácido 180. Como resultado, esta sustitución de aminoácido en la posición 180 se consideró una posibilidad de generar un epítomo de células T potencial en la cadena ligera de unión de CLDN6 de CS2425.

De acuerdo con los resultados del análisis de inmunogenicidad, la sustitución de aminoácidos T180K en la CL ligada a la VL de unión a CLDN6 provocó un alto riesgo de inmunogenicidad, por lo que esta mutación no se adoptó para producir el anticuerpo biespecífico anti-CLDN6/CD3.

El VH 65H0671Q39E de unión a CLDN6 se unió a una primera región de dominio CH1 que se muestra en SEC ID NO: 95, el VL 54L0571Q38K de unión a CLDN6 se unió a un primer dominio CL mostrado en SEC ID NO: 63 para hacer una primera cadena ligera mostrada en SEC ID NO: 102. El VH de unión a CD3 mostrado en SEC ID NO: 60 se unió a un segundo dominio CH1 mostrado en SEC ID NO: 97, el VL de unión a CD3 mostrado en SEC ID NO: 61 se unió a un segundo dominio CL mostrado en SEC ID NO: 62 para hacer una segunda cadena ligera mostrada en SEC ID NO: 98. Los dominios CH1 y los dominios CL también contienen

sustituciones de aminoácidos en comparación con las naturales, que son: Glu (E) en la posición 147, 175 y 213 en el primer dominio CH1; Lys (K) en la posición 123, 131 y 160 en el primer dominio CL; Lys (K) en la posición de aminoácido 175 en el

5 segundo dominio CH1; y Glu (E) en la posición de aminoácido 131, 160 y 180 en el segundo dominio CL. El primer dominio CH1 se unió además a una primera región bisagra-CH2-CH3 para hacer una primera cadena pesada que se muestra en SEC ID NO: 99, el segundo dominio CH1 se unió más a una segunda región

10 bisagra-CH2-CH3 para hacer una segunda cadena pesada mostrada en SEC ID NO: 100. Como resultado, el anticuerpo 65H0671Q39E-SG1189v14k/54L0571Q38K-SK1021//TR01H(Q39K) - SG1191v14h/TR01L(Q38E)-SK1017 (primera cadena pesada SEC ID NO: 99, primera cadena ligera SEC ID NO: 102, segunda cadena

15 pesada SEC ID NO: 100, segunda cadena ligera SEC ID NO: 98).

La heterogeneidad de la carga se evaluó usando Maurice (ProteinSimple) con el cartucho cIEF (PS-MC02-C). La carga de la muestra se llevó a cabo durante 55 s. Posteriormente, se llevó a cabo el enfoque a 1500 V durante 1

20 min y 3000 V durante 6 min. La detección fue la absorbancia UV a 280 nm. Para el anolito, se usaron ácido fosfórico 80 mM en metilcelulosa al 0.1%, y para el catolito, hidróxido de sodio 100 mM en metilcelulosa al 0.1%. Cada solución de muestra contenía cantidades constantes de muestra de 0.085 mg/mL,

25 Pharmalyte 5-8 al 2%, Pharmalyte 8-10.5 al 2%, metilcelulosa

al 0.42%, urea 3.6 M, Arg 10 mM, marcador pI al 1% 5.85 y marcador pI al 1% 10.17. Se usó el software asociado Compass para iCE (2.0.10) para el análisis de datos.

La figura 16B mostró la heterogeneidad de carga del anticuerpo resultante cuando la primera cadena pesada, la primera cadena ligera, la segunda cadena pesada y la segunda cadena ligera preparadas anteriormente se expresaron juntas. El electroferograma sugirió que ambas mutaciones tenían un buen control de HH y HL, porque no había otros picos obvios aparte del pico principal alrededor de pI 9.0.

Se generó el anticuerpo IgG bivalente que se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18

Nombre del anticuerpo	Cadena pesada	Cadena ligera
CS2652	cadena pesada de anticuerpo-A	54L0571Q38K-SK1021

En la cadena ligera de CS2652, el VL 54L0571Q38K que se une a CLDN6 se unió a un dominio CL que se muestra en SEC ID NO: 63 para hacer la cadena ligera que se muestra en SEC ID NO: 102. El dominio CL contiene sustituciones de aminoácidos en comparación con las naturales, que son: Lys (K) en la posición 123, 131 y 160.

La potencial inmunogenicidad de los anticuerpos usando como indicador la proporción de células T CD4⁺ secretoras de IL-2. Como se muestra en la figura 26, la frecuencia de donantes positivos para CS2652 fue similar a la

del anticuerpo A. Por lo tanto, se consideró que este anticuerpo no tenía un alto potencial inmunogénico.

EJEMPLO 6-2: Generación de variantes de región variable de unión a CLDN6

5 Aunque AE3-20/TR01 y CS2201 muestran una gran eficacia sin ninguna toxicidad en el ratón, CS2425 causa inesperadamente un daño hepático grave en el ratón. Se especuló que las modificaciones de la secuencia de aminoácidos en las regiones variables de unión a CLDN6 descritas en el

10 Ejemplo 5 podrían tener un impacto sobre el carácter del anticuerpo y, posteriormente, provocaron toxicidad. Para confirmar qué modificaciones afectan al anticuerpo para causar toxicidad hepática, se construyeron variantes de la región variable de unión a CLDN6 que tienen menos sustituciones de

15 aminoácidos en comparación con las de CS2425.

Las variantes de la región variable de unión de CLDN6 construidas, junto con las regiones variables que muestran actividad de unión hacia CD3 humano (VH SEC ID NO: 70; VL SEC ID NO: 71) se usaron para generar

20 anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 usando la técnica de intercambio de brazos Fab reportada por Igawa et al. (WO 2016159213). Las regiones variables comprendidas en los anticuerpos anti-CLDN6/CD3 se muestran en la Tabla 19 y la Tabla 20, y los anticuerpos

25 biespecíficos generados que se muestran en la Tabla 21

contienen un Fc silencioso con afinidad atenuada por el receptor Fc gamma.

La unión a ECM de estos anticuerpos también se evaluó mediante el método descrito en el Ejemplo 4. Como resultado,

5 todos estos anticuerpos mostraron una unión a ECM baja.

Tabla 19

10	Nombre de VH de unión a CLDN6	Sustituciones de aminoácido en CDRs comparadas con 25H	Sustituciones de aminoácido en FRs comparadas con 25H	SEC ID NO
	25H	-	-	33
	65H	Ninguna	R16G, A84D, Q105E	84
	65HQ39E	Ninguna	R16G, A84D, Q105E, Q39E	85
	25HQ39E	Ninguna	Q39E	83
	65H0671	T33V, M34G, G54V, S62V, Y97F	R16G, A84D, Q105E	50

15 **Tabla 20**

20	Nombre de VL de unión a CLDN6	Sustituciones de aminoácido en CDRs comparado con 20L0532	Sustituciones de aminoácido en FRs comparado con 20L0532	SEC ID NO
	20L0532	-	-	43
	54L0532	Ninguna	K45E, S60D, L104V, K107E	86
	54L0532Q38K	Ninguna	K45E, S60D, L104V, K107E, Q38K	87
	20L0532Q38K	Ninguna	Q38K	88
	54L0571	S31L, Y50L, D56I	K45E, S60D, L104V, K107E	54

Tabla 21

Nombre de anticuerpo	VH de unión a CLDN6	VL de unión a CLDN6	SEC ID NO: de					
			VH de unión a CD3	VL de unión a CD3	CH1 enlazado a VH de unión a CLDN6	CL enlazado a VL de unión a CLDN6	CH1 enlazado a VH de unión a CD3	CL enlazado a VL de unión a CD3
CS2884	65H	54L0532	70	71	103	81	103	81
CS2885	25H	54L0532			103	81	103	81
CS2886	65H	20L0532			103	81	103	81
CS2958	65HQ39E	54L0532Q38K			95	63	97	62
CS2959	25HQ39E	20L0532Q38K			95	63	97	62
CS2960	65H0671	54L0571			103	81	103	81

10 EJEMPLO 6-3. Evaluación de eficacia y toxicología de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3

Para evaluar la eficacia antitumoral y la seguridad de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 generados, se llevaron a cabo estudios en ratones *in vivo* mediante el modelo de inyección de células T OV-90 como sigue. Se administró a 15 ratón portador de tumor OV-90 CS2201, CS2425, CS2884, CS2885, CS2886, CS2958, CS2959 y CS2960 a 5 mg/kg, luego se calcularon el volumen del tumor y el peso corporal. También se extrajo sangre después del tratamiento y luego se usó para analizar el 20 nivel plasmático de los marcadores de lesión hepática.

La figura 27 indica el resultado de un experimento *in vivo* usando CS2884, CS2885 y CS2886 además de CS2201 y CS2425. Como se describe en la Tabla 21, estos anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 parcialmente optimizados 25 comprenden las sustituciones de aminoácidos descritas en el

Ejemplo 5-2. Como se muestra en la figura 27, CS2884, CS2885 y CS2886 mostraron un efecto inhibidor del crecimiento contra el tumor OV-90. No hubo cambios en el peso corporal ni en los marcadores de daño hepático entre los ratones que recibieron
5 estos anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 excepto para CS2425 totalmente optimizado. Este resultado indica que las sustituciones de aminoácidos descritas en el Ejemplo 5-2 no fueron la causa de la lesión hepática (figura 28).

La figura 29 indica el resultado de un experimento
10 *in vivo* usando CS2958, CS2959 y CS2960 además de CS2201 y CS2425. Como se describe en la Tabla 21, CS2958 comprende las sustituciones de aminoácidos descritas en el Ejemplo 5-2 y Ejemplo 5-3, CS2959 solo comprende las sustituciones de aminoácidos de la región variable descritas en el Ejemplo 5-3,
15 CS2960 comprende las sustituciones de aminoácidos descritas en el Ejemplo 5 -1 y Ejemplo 5-2. Como se muestra en la figura 29, estos anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 redujeron el crecimiento tumoral, sin embargo, se observó una disminución significativa del peso corporal en los grupos de tratamiento
20 con CS2425 y CS2960. De acuerdo con la pérdida de peso corporal, también se encontró una elevación significativa de los marcadores de toxicidad hepática en los grupos de tratamiento con CS2425 y CS2960 (figura 30).

El resultado que muestra que CS2425 y CS2960 causaron
25 daño hepático sugirió que las sustituciones de aminoácidos

descritas en el Ejemplo 5-1 eran las más probables de ser la causa de la toxicidad.

Como se muestra en la figura 31, la semivida plasmática ($T_{1/2}$) de CS2201, CS2958, CS2959 y CS2960 fue de 3.26, 3.77, 3.68 y 3.45 días, respectivamente. El área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de cero a infinito (AUC_{inf}) de CS2201, CS2958, CS2959 y CS2960 fueron 90.0, 134, 106 y 117 días* μ g/mL, respectivamente.

EJEMPLO 6-4. Optimización de fc

Para seleccionar las regiones Fc, se generaron varias variantes de Fc como se muestra en la Tabla 22. introducido (tal como se describe en el documento WO2006106905).

Tabla 22

Nombre de FC	Mutación silenciosa en FcgR	Mutación de desglucosilación	Mutación de estabilización	Cadena Pesada Hetero	SEC ID NO
SG1212	L234A, L235A, A327G, A330S, P331S	N297A	S239K	K439E	72
SG1213	L234A, L235A, A327G, A330S, P331S	N297A	S239K	E356K	73
SG1260	L234A, L235A, A327G, A330S, P331S	N297A		K439E	74
SG1261	L234A, L235A, A327G, A330S, P331S	N297A		E356K	75
SG1323	L234A, L235A	N297A	S239K	K439E	76
SG1324	L234A, L235A	N297A	S239K	E356K	77
SG1325	L234A, L235A	N297A		K439E	78
SG1326	L234A, L235A	N297A		E356K	79

EJEMPLO 6-5. Generación de CS2961, CS3346, CS3347 y CS3348

Usando estas variantes de Fc, se construyeron cuatro anticuerpos biespecíficos que se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23

5		Nombre del anticuerpo			
		CS2961	CS3346	CS3347	CS3348
10	VH de unión a CLDN6	65HQ39E			
	1er CH1 enlazado a la VH de unión a CLDN6	SEC ID NO: 95			
	Región Fc enlazada al 1er CH1 a través de dominio de bisagra	SG1212	SG1260	SG1323	SG1325
	Cadena pesada de unión a CLDN6	SEC ID NO: 104	SEC ID NO: 105	SEC ID NO: 106	SEC ID NO: 107
15	VL de unión a CLDN6	54L0532Q38K			
	1er CL enlazado a la VL de unión a CLDN6	SK1021	SK1021	SK1021	SK1021
	Cadena ligera de unión a CLDN6	SEC ID NO: 112	SEC ID NO: 112	SEC ID NO: 112	SEC ID NO: 112
	VH de unión a CLDN6	SEC ID NO: 60			
20	2do CH1 enlazado a la CH de unión a CD3	SEC ID NO: 97			
	Región Fc enlazada al 2do CH1 a través de dominio de bisagra	SG1213	SG1261	SG1324	SG1326
	Cadena pesada de unión a CD3	SEC ID NO: 108	SEC ID NO: 109	SEC ID NO: 110	SEC ID NO: 111
	VL de unión a CD3	SEC ID NO: 61			
25	2do CL enlazado a la VL de unión a CD3	SK1017	SK1017	SK1017	SK1017
	Cadena ligera de unión a CD3	SEC ID NO: 98	SEC ID NO: 98	SEC ID NO: 98	SEC ID NO: 98

EJEMPLO 7. Caracterización de CS2961, CS3346, CS3347
y CS3348

EJEMPLO 7-1. Actividad de activación de células T
de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de
5 células que expresan proteínas de la familia CLDN

La figura 32 muestra la actividad de activación de células T de diversas concentraciones de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, CS2201, 6PHU3/TR01, CS2425 y CS2961) en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF,
10 hCLDN4/BaF, hCLDN9/BaF o hCLDN6(Q156L)/BaF determinados por el método descrito en el Ejemplo de referencia 3. Todos nuestros anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 indujeron la activación de células T en presencia de hCLDN6/BaF. Además,
15 10 nM de AE3-20/TR01 indujeron una activación de células T un poco más alta en presencia de hCLDN4/BaF y hCLDN6(Q156L)/BaF que los otros anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 y 10 nM de 6PHU3/TR01 inducidos un poco más de activación de células T en presencia de hCLDN9/BaF.

La figura 33 muestra la actividad de activación de
20 células T de diversas concentraciones de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 como CS2201, CS2961, CS3346, CS3347 y CS3348 en presencia de hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF o hCLDN9/BaF determinado por el método descrito en el Ejemplo de referencia 3. Todos nuestros anticuerpos
25 biespecíficos anti-CLDN6/CD3 indujeron la activación de

células T en presencia de hCLDN6/BaF y no se observó activación de células T por todos nuestros anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF y hCLDN9/BaF.

EJEMPLO 7-2. Medición de la citotoxicidad celular

5 dependiente de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3

La figura 34 muestra la citotoxicidad celular dependiente de células T de anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 (AE3-20/TR01, CS2201, 6PHU3/TR01, CS2425, CS2961,
 10 CS3346, CS3347 y CS3348) contra la línea celular de cáncer de ovario OVCAR3 expresando CLDN6. La citotoxicidad celular se evaluó mediante un ensayo de LDH usando PBMCs humanas (StemCell). Se sembraron 20,000 células objetivo y 200,000 PBMCs humanas (E/T = 10) en cada pocillo de una placa de fondo
 15 en U de 96 pocillos y se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpo durante 24 horas a 37 grados C y 5% de CO₂. La destrucción de las células objetivo se midió mediante el kit de detección de citotoxicidad LDH (Takara Bio). La actividad citotóxica (%) de cada anticuerpo se calculó usando la
 20 siguiente fórmula.

$$\text{Actividad citotóxica (\%)} = (A - B - C) \times 100 / (D - C)$$

"A" representa la absorbancia de los pocillos tratados con anticuerpo y PBMC, "B" representa el valor de
 25 absorbancia promedio de las células efectoras PBMC solamente,

"C" representa el valor de absorbancia promedio de las células objetivo no tratadas solamente y "D" representa los valores promedio de pocillos lisados con Triton-X. Se ha contabilizado y restado la absorbancia de fondo. Todos nuestros anticuerpos
5 biespecíficos anti-CLDN6/CD3 mostraron citotoxicidad celular dependiente de células T contra células OVCAR3.

EJEMPLO 7-3. Análisis FACS de la especificidad de CS2961 contra la familia CLDN

La secuencia de aminoácidos está altamente conservada
10 entre CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9. Por lo tanto, examinamos la especificidad de unión de CLDN6 mediante análisis FACS. hCLDN6/BaF, hCLDN3/BaF, hCLDN4/BaF y hCLDN9/BaF se incubaron con CS2201, CS2961, AH05/TR01 y 6PHU3/TR01 a 15 µg/mL. Se usó KLH/TR01 generado en el Ejemplo 2-3 como control de tinción.
15 La unión de cada uno de los anticuerpos se detectó con IgG antihumana conjugada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Las células muertas se separaron mediante tinción con eFlour 780 (Invitrogen).

Como se muestra en las figuras 35A y 35B, todos los
20 anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 mostraron una fuerte unión a hCLDN6/BaF. Entre los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 evaluados, CS2961 mostró la mejor especificidad hacia CLDN6.

EJEMPLO 7-4. Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de CS2961, CS3346, CS3347 y
25 CS3348. Cada uno de los anticuerpos se dializó contra PBS, pH

7.4 y la concentración se ajustó a 1 mg/mL luego de la recuperación. Las muestras se almacenaron a 5 grados C y 40 grados C durante una semana y a 40 grados C durante dos semanas. Después del almacenamiento, el análisis SEC se llevó a cabo
5 usando una columna SWXL G3000 (TOSOH) con NaFosfato 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0 como amortiguador de funcionamiento. La detección se llevó a cabo mediante un detector de UV (280 nm). Los cromatogramas se analizaron usando el software Empower 3 (Waters).

10 El resultado mostrado en la figura 36 indicó que todos los anticuerpos muestran una buena estabilidad, que seguramente es mucho mejor que la de la molécula sc(Fv)₂ biespecífica.

EJEMPLO 7-5. Eficacia y seguridad *in vivo*

15 Para evaluar la eficacia antitumoral y la seguridad de CS2961, se llevaron a cabo estudios en ratones *in vivo* de la siguiente manera. Se administró a ratón portador de tumor OV-90 con CS2961 purificado a 5 mg/kg, luego se calcularon el volumen del tumor y el peso corporal. También se extrajo
20 sangre después del tratamiento y luego se usó para analizar el nivel plasmático de los marcadores de lesión hepática.

La figura 29 muestra el resultado de un experimento *in vivo* usando CS2961. Como se muestra en la figura 29, CS2961 redujo el volumen del tumor sin disminuir el peso corporal de
25 los ratones tratados y sin aumentar los marcadores de toxicidad

hepática (figura 30).

Como se muestra en la figura 31, la semivida plasmática ($T_{1/2}$) de CS2961 fue de 11.2 días, el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo de cero a infinito (AUC_{inf}) de CS2961 fue de 486 días*µg/mL. Estos resultados indicaron que CS2961 mostró una tasa de eliminación más lenta en comparación con los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 generados por la tecnología de intercambio de brazos Fab.

CS2961 mostró una potente actividad antitumoral contra el tumor OV-90 y un buen perfil de seguridad y PK en ratón. Además, este anticuerpo mostró una estabilidad mejorada, una mejor formación de heterodímeros que son preferibles para la producción a gran escala. CS2961 también es más fácil de purificar debido a las sustituciones de aminoácidos descritas en el Ejemplo 5-2.

EJEMPLO 7-6. Eficacia *in vivo* dependiente de la dosis

La potencia *in vivo* de CS3348 se comparó con AE3-20/TR01 usando el modelo de inyección de células T OV-90 como se describe en el Ejemplo 2-4.

Después de que el volumen tumoral alcanzara alrededor de 200 mm³ en los ratones, los animales se aleatorizaron y se les administró cada vehículo o anticuerpo biespecífico. La figura 37 muestra el crecimiento tumoral de ratones tratados

con AE3-20/TR01, y la figura 38 muestra aquellos con CS3348. En el experimento, la célula cancerosa OV-90 se trasplantó a los ratones el día 0, se administraron varias dosis de AE3-20/TR01 a los ratones el día 14 y se administraron varias dosis
 5 de CS3348 a los ratones el día 15. Todos los ratones recibieron una administración.

Se observó una eficacia significativa contra los tumores OV-90 tanto en AE3-20/TR01 como en CS3348 de manera dependiente de la dosis sin pérdida de peso corporal en todas
 10 las dosis.

Es de destacar que la regresión del tumor se observó en ratones tratados con 0.04 mg/kg de CS3348, mientras que se observó en ratones tratados con 1 mg/kg de AE3-20/TR01. En otras palabras, es probable que la eficacia antitumoral de CS3348 sea
 15 aproximadamente 25 veces más fuerte que la de AE3-20/TR01.

EJEMPLO 8. Estudio de toxicidad y eficacia antitumoral *in vivo*

La eficacia *in vivo* y la toxicidad de los anticuerpos se evaluaron usando un modelo de ratones portadores de tumores.
 20 Las líneas celulares de cáncer humano OVCAR-3, NCI-H1435 o NUGC-3 que expresan claudina-6 humana se trasplantaron por vía subcutánea en ratones NOD/ShiJic-scid. Los ratones portadores de tumores se asignaron al azar a grupos de tratamiento para recibir control de vehículo o Ab cuando el tamaño del tumor
 25 alcanzó aproximadamente 200 mm³ (denominado modelo de inyección

de células T).

Es decir, se llevó a cabo la siguiente prueba en la prueba de eficacia hacia OVCAR-3, NCI-H1435 o NUGC-3 usando un modelo de inyección de células T. La expansión de las células T se llevó a cabo usando PBMCs humanas (AllCells) y un kit de activación/expansión de células T (Miltenyi Biotec). Se mezclaron 1×10^7 células de células cancerosas y matriz de membrana basal Matrigel (BD) y se trasplantaron por vía subcutánea en la región lateral de los ratones NOD/ShiJic-scid (CLEA Japón, hembra, 6 - 7 semanas de edad). El día del trasplante se definió como el día 0. Después de la aleatorización y el agrupamiento de acuerdo con el tamaño del tumor y el peso corporal, se administró por vía intraperitoneal el anticuerpo anti-asialo GM1 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) por vía intraperitoneal a 0.2 mg/ratón. Al día siguiente, las células T que se obtuvieron mediante el cultivo de expansión se implantaron intraperitonealmente a 3×10^7 células/ratón. Los detalles de los grupos se muestran en la Tabla 24. Aproximadamente cuatro horas después del trasplante de células T, se administró CS3348 por vía intravenosa. La administración de CS3348 se llevó a cabo solo una vez. Se midieron la longitud (L) y el ancho (W) de la masa tumoral y el peso corporal, y se calculó el volumen tumoral (TV) como:

$$TV = (L \times W \times W) / 2.$$

Como se muestra en las figuras 40 a 42 (figura 40:

ratones portadores OVCAR-3, figura 41: ratones portadores NCI-H1435 y figura 42: ratones portadores NUGC-3), CS3348 mostró una obvia actividad antitumoral contra estas 3 líneas de células cancerosas como de manera dependiente de la dosis sin ninguna toxicidad, incluida la pérdida de peso corporal.

Tabla 24 - Detalles de los grupos de estudio para la evaluación de la eficacia antitumoral *in vivo*

a. Grupo de estudio en TK220001 (ratones portadores de OVCAR-3)

Grupo	Anticuerpo	Dosis
1	vehículo	
2	CS3348	0.0008 mg/kg
3	CS3348	0.004 mg/kg
4	CS3348	0.02 mg/kg
5	CS3348	0.1 mg/kg
6	CS3348	0.5 mg/kg
7	CS3348	2.5 mg/kg

b. Grupo de estudio en TK219005 (ratones portadores de NCI-H1435)

Grupo	Anticuerpo	Dosis
1	vehículo	
2	CS3348	0.02 mg/kg
3	CS3348	0.1 mg/kg
4	CS3348	0.5 mg/kg

c. Grupo de estudio en TK220003 (ratones portadores de NUGC-3)

Grupo	Anticuerpo	Dosis
1	vehículo	
2	CS3348	0.004 mg/kg
3	CS3348	0.02 mg/kg
4	CS3348	0.1 mg/kg

EJEMPLO de referencia 1. Preparación del vector de expresión del anticuerpo y expresión y purificación del anticuerpo

La sustitución de aminoácidos o la conversión de
5 IgG se llevó a cabo mediante un método generalmente conocido
por los expertos en la técnica usando PCR, o el kit de
clonación In fusion Advantage PCR (Takara Bio Inc.), etc.,
para construir vectores de expresión. Los vectores de
expresión obtenidos se secuenciaron mediante un método
10 generalmente conocido por los expertos en la técnica. Los
plásmidos preparados se transfirieron transitoriamente a
células FreeStyle 293 (ThermoFisher Scientific) o células
Expi293F (ThermoFisher Scientific) para expresar
anticuerpos. Cada anticuerpo se purificó a partir del
15 sobrenadante de cultivo obtenido mediante un método
generalmente conocido por los expertos en la técnica usando
rProtein A Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare Japan Corp.).
En el caso de anticuerpos biespecíficos, es necesaria la
cromatografía de proteína L (Protenova) para eliminar los
20 homodímeros (documento WO2018159615). En cuanto a la
concentración del anticuerpo purificado, la absorbancia se
midió a 280 nm usando un espectrofotómetro, y la
concentración de anticuerpo se calculó mediante el uso de un
coeficiente de extinción calculado a partir del valor
25 obtenido por PACE (Protein Science 1995; 4: 2411-2423).

EJEMPLO de referencia 2. Generación de células que expresan Claudina

Células Ba/F3 que expresan CLDN6 humana (hCLDN6/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN9 humana (hCLDN9/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN3 humana (hCLDN3/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN4 humana (hCLDN4/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN6 de ratón (mCLDN6/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN9 de ratón (mCLDN9/BaF), células Ba/F3 que expresan CLDN3 de ratón (mCLDN3/BaF) y células Ba/F3 que expresan CLDN4 de ratón (mCLDN4/BaF), se establecieron transfectando los vectores de expresión CLDN6 humana, CLDN9 humana, CLDN3 humana, CLDN4 humana, CLDN6 de ratón, CLDN9 de ratón, CLDN3 de ratón y CLDN4 de ratón en la línea de células Ba/F3 de ratón pro B, respectivamente.

Las proteínas de la familia de las claudinas tienen dos dominios extracelulares que son accesibles al anticuerpo. Con respecto a la similitud de la secuencia de aminoácidos entre los dominios extracelulares de CLDN6 humana y CLDN9 humana, el primer dominio extracelular es casi el mismo y solo hay dos aminoácidos diferentes en el segundo dominio extracelular (figura 39). La glutamina en la posición 156 de la Claudina 6 humana (posición 156 en la secuencia mostrada en SEC ID NO: 125 o 126) se sustituyó por leucina para producir un mutante de CLDN6 humana que comprende el mismo aminoácido que la Claudina 9 humana en la posición 156. Este mutante

humano de CLDN6 se denominó hCLDN6 (Q156L) (SEC ID NO: 134). Se generó el transfectante Ba/F3 que expresa establemente hCLDN6 (Q156L) usando un método similar descrito anteriormente. El transfectante Ba/F3 establecido se denominó hCLDN6
5 (Q156L)/BaF.

Las células transfectantes FreeStyle™ 293-F expresadas transitoriamente CLDN3, 4, 6 y 9 humanas y de ratón se generaron mediante la introducción del vector de expresión de CLDN humanas y de ratón (incluidas CLDN6, CLDN9, CLDN3 y
10 CLDN4) en células FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) usando 293fectin (Invitrogen). Las células transfectantes FreeStyle™ 293-F generadas se denominaron hCLDN3/FS293, hCLDN4/FS293, hCLDN6/FS293, hCLDN9/FS293, mCLDN3/FS293, mCLDN4/FS293, mCLDN6/FS293 y mCL3DN9, respectivamente.

15 EJEMPLO de referencia 3. Ensayo de actividad de activación de células T usando ensayo de gen de informe Jurkat

La activación de células T de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN6/CD3 en presencia de células objetivo se examinó mediante un bioensayo de activación de células T
20 usando células GloResponse™ NFAT-luc2 Jurkat (Promega). Un tipo de células seleccionadas de las células que expresan claudina generadas en el Ejemplo de referencia 2 y líneas de células cancerosas se usaron como célula objetivo en cada ensayo.

25 En primer lugar, se sembraron 2×10^4 células

objetivo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Corning) a 25 µl/pocillo. A continuación, se añaden 1×10^5 de la línea celular indicadora Jurkat/NFAT-RE en cada pocillo como células efectoras, lo que hace que la

5 proporción de células efectoras y células objetivo en cada pocillo sea de 5:1. Luego, se agregaron a los pocillos 25 µl de soluciones de anticuerpos con diferentes concentraciones (la concentración de anticuerpos se determinó ensayo por ensayo), respectivamente. Después de

10 un cultivo durante la noche a 37 grados C, se agregaron 75 µl de reactivo Bio-Glo (Promega) a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La luminiscencia (RLU) que surge de la activación de células Jurkat en cada pocillo se midió mediante un lector de

15 microplacas Explorer EnVision (PerkinElmer Japan) o GloMax (marca registrada). La relación de luminiscencia de cada pocillo se calculó comparando entre los pocillos con y sin anticuerpo.

Aunque las invenciones anteriores se han descrito con

20 cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. Las descripciones de toda la literatura científica y de patentes citadas en este documento se incorporan

25 expresamente en su totalidad como referencia.

Aplicabilidad Industrial

Las moléculas de unión a antígeno de la presente invención son útiles para tratar y/o prevenir cánceres, detectar la presencia de CLDN6 en una muestra biológica y

5 diagnosticar varios cánceres. Una de las modalidades de la molécula de unión a antígeno son las moléculas de unión a antígeno que muestran actividad de unión hacia CLDN6 y el complejo del receptor de células T que permiten el tratamiento del cáncer al tener células T cercanas a las células que

10 expresan CLDN6 y usando la citotoxicidad de las células T contra CLDN6- expresando células cancerosas.