

ANTICUERPO DIRIGIDO CONTRA CLDN18.2, ANTICUERPO BIESPECÍFICO Y EL USO DE ESTOS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al campo de la biomedicina y, en particular, a un anticuerpo dirigido contra CLDN18.2, un anticuerpo biespecífico y el uso de estos.

ANTECEDENTES

Hoy en día, el cáncer es una de las enfermedades más mortíferas de los seres humanos. De acuerdo con el Informe de 2018 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se detectan aproximadamente 18.07 millones de casos nuevos de cáncer al año. Anualmente fallecen aproximadamente 9.55 millones de personas de cáncer. Según los cálculos de la OMS, el cáncer gástrico ocupa la quinta posición entre los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial. El cáncer gástrico ocupa la tercera posición (para los hombres) y la cuarta (para las mujeres) entre las causas de muertes relacionadas con el cáncer. Anualmente se detectan un millón de casos nuevos de cáncer gástrico a nivel mundial. En los Estados Unidos, aproximadamente el 35% de los pacientes a los que se les diagnostica principalmente cáncer gástrico tienen cáncer gástrico metastásico. La tasa de supervivencia al cabo de cinco años para las personas a las que se les diagnostica cáncer gástrico avanzado es de un 5% y la mediana de supervivencia es de aproximadamente 6 meses. La medicación de primera línea para tratar a los pacientes con cáncer gástrico metastásico/recurrente se divide en dos casos: (1) para los pacientes positivos para HER2-neu, se emplea Trastuzumab combinado con fármacos quimioterápicos; (2) para los pacientes negativos para HER2-neu, el tratamiento se limita a fármacos quimioterápicos; sin embargo, el resultado del tratamiento no es bueno (*Front Pharmacol.*, 13 de septiembre de 2018; 9: 404).

La variante de empalme 1 (CLDN18A1, en concreto CLDN18.1, con el número de acceso al Genbank NP_057453, NM016369) y la variante de empalme 2 (CLDN18A2, en concreto CLDN18.2, con el número de acceso al Genbank NM_001002026, NP_001002026) de la molécula CLDN18 (Claudina 18) son proteínas transmembranarias integrales con un peso molecular de aproximadamente 27.9/27.72 kD. Las claudinas con proteínas membranas integrales situadas en la unión estrecha de un epitelio y endotelio. Las otras dos proteínas principales de la familia de la unión estrecha son la ocludina y la molécula de adhesión de la unión (JAM, por sus siglas en inglés). Las claudinas con componentes esenciales de las uniones estrechas y desempeñan un papel importante para mantener la polaridad de las células epiteliales, controlar la difusión paracelular, y regular el crecimiento y la diferenciación de las células. Se sospecha que las claudinas apenas pueden acercarse a los anticuerpos en los epitelios bien contruidos pero quedan expuestas en las células tumorales. La molécula de claudina cruza una membrana celular cuatro veces, con tanto el extremo N como C en el citoplasma. La proteína CLDN18.2 (Claudina 18.2) humana es una proteína transmembranaria

que tiene una longitud completa de 261 aminoácidos, entre los que 1–23 forman un péptido señal; tiene dos regiones extramembranas después del péptido señal, un bucle extracelular 1 (ECL1) de aproximadamente 55 aminoácidos y un ECL2 de aproximadamente 23 aminoácidos. CLDN18.1 (Claudina 18.1) y CLDN18.2 difieren en los primeros 21 aminoácidos del extremo N que incluyen la primera TM y el bucle 1 (es decir, ECL1) pero tienen secuencias de proteína primaria idénticas en el extremo C. Las regiones ECL1 de la CLDN18.2 humana y la CLDN18.1 humana son muy similares, y las regiones ECL2 de la CLDN18.2 humana y la CLDN18.1 humana son idénticas. Por tanto, el desarrollo de anticuerpos que tengan la proteína CLDN18.2 humana como diana requiere la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra la región ECL1 o la estructura espacial de la proteína CLDN18.2 humana. Esto complica la labor en este aspecto. CLDN18.1 se expresa selectivamente en el epitelio del estómago y los pulmones normales (*Mol Cell Biol.* Noviembre de 2001; 21(21): 7380-90). La expresión de CLDN18.2 en los tejidos normales está muy limitada a las células diferenciadas del epitelio gástrico y está ausente de la región de las células madre gástricas. Pero se expresa en altos niveles en varios tipos de cáncer, que incluyen tumores gástricos, esofágicos, pancreáticos y pulmonares, así como líneas celulares cancerosas humanas. El peso molecular de la proteína varía en algunos cánceres y tejidos normales adyacentes. Las proteínas con un peso molecular alto observadas en tejidos sanos pueden convertirse en las que tienen el mismo peso molecular que se observan en el cáncer al tratar el lisado tisular con el compuesto desglucosilante PNGaseF. Esto sugiere que la claudina está menos N-glucosilada en el cáncer que su homóloga en el tejido normal. Esta diferencia estructural es probable que origine un epítipo alterado. Un motivo de N-glucosilación clásico se encuentra en el aminoácido de la posición 116 dentro del dominio D3 de bucle de la molécula. (Documento CN103509110B).

En la actualidad, los estudios sobre anticuerpos monoclonales para CLDN18.2 se limitan a los ensayos clínicos de fase II y fase III del anticuerpo Claudiximab (IMAB362) (véase el documento WO 2014/146672). IMAB362 es capaz de inducir efectos ADCC (siglas en inglés de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), así como mediar la destrucción del tumor. IMAB362 mostró un efecto prometedor en los ensayos clínicos de fase I y II para el tratamiento del cáncer gastroesofágico avanzado (*Eur J Cancer.* Septiembre de 2018; 100: 17-26). Sin embargo, IMAB362 es un anticuerpo quimérico humano o murino y, por tanto, supone un riesgo de inmunogenia y la afinidad no es alta. Debido a los problemas médicos sin resolver para un gran número de neoplasias malignas, se necesitan otros anticuerpos contra CLDN18.2 con características farmacéuticas más deseables. Por lo tanto, en la técnica no se dispone de anticuerpos eficaces que actúen sobre la proteína CLDN18.2 humana, en particular, anticuerpos monoclonales completamente humanos, así como anticuerpos monoclonales con mejor actividad de unión a las células.

En la actualidad, el anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 en fase de desarrollo clínico incluye AMG910 de Amgen. AMG910 puede inducir un efecto TDCC (siglas en inglés de la citotoxicidad celular dependiente de los linfocitos T) para mediar la destrucción del tumor. Sin embargo, los anticuerpos de la técnica anterior pueden presentar los problemas de semividas cortas, unos efectos farmacológicos pobres, provocar el síndrome de liberación de citocinas (CRS, por sus siglas en inglés), etc. Por lo tanto, se necesita desarrollar con urgencia anticuerpos biespecíficos más seguros y más eficaces que actúen sobre tanto CD3 como CLDN18.2 humanas y puedan unirse a CD3 y CLDN18.2 de macaco.

COMPENDIO

Para resolver los problemas técnicos en la técnica anterior en cuanto a la carencia de anticuerpos monoclonales seguros y eficaces dirigidos contra CLDN18.2 humana y anticuerpos biespecíficos que actúen sobre tanto CD3 como CLDN18.2 humanas y que puedan unirse a CD3 y CLDN18.2 de macaco, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal dirigido contra CLDN18.2, un anticuerpo biespecífico dirigido contra CLDN18.2 y CD3, y el uso de estos.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un primer aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo dirigido contra CLDN18.2 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 16–18, la HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 42–46 y las SEQ ID NO: 48–54, y la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 77–82.

En una realización preferida de la presente invención, la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 42 y la SEQ ID NO: 77, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 79, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 80, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 80, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 81, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 46 y la SEQ ID NO: 82, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

5 la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

10 la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 52 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o

la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 79, respectivamente; o

15 la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 54 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente.

Las combinaciones anteriores de secuencias de aminoácidos para la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 se detallan a continuación en la Tabla a.

Tabla a. La combinación de HCDR del anticuerpo dirigido contra CLDN18.2

20	N.º	HCDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		Anticuerpo N.º	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes
25	1	PR004227	16	GFTFSSY	42	NNDGSS	77	APPYGNYERDY
	2	PR004533	16	GFTFSSY	43	NSDGSR	78	GEDHDILTGYPI
	3	PR004536	16	GFTFSSY	44	NSDGST	79	DFPVLGGSHFDFQH
30	4	PR004540	17	GFTFSIY	45	SSDGNV	80	GEDHDMLTGYPV
	5	PR004949	18	GFTFSAY	43	NSDGSR	80	GEDHDMLTGYPV
	6	PR004950	18	GFTFSAY	43	NSDGSR	78	GEDHDILTGYPI
35	7	PR004952	16	GFTFSSY	43	NSDGSR	81	GEDHDILTGYPV
	8	PR004953	16	GFTFSSY	46	GYDGRN	82	HFPSLPGTTDTFDI
	9	PR007242	16	GFTFSSY	48	NFDSSR	78	GEDHDILTGYPI

10	PR007243	16	GFTFSSY	49	SSAGSR	78	GEDHDILTGYPI
11	PR007244	16	GFTFSSY	50	DSRGSR	78	GEDHDILTGYPI
12	PR007245	16	GFTFSSY	51	SSDASR	78	GEDHDILTGYPI
13	PR007246	16	GFTFSSY	52	SSTGSR	78	GEDHDILTGYPI
14	PR007247	16	GFTFSSY	53	NPLGST	79	DFPVLGGSHFDF QH
15	PR007248	16	GFTFSSY	54	NHDSSR	78	GEDHDILTGYPI

En una realización preferida de la presente invención, la región variable de cadena pesada comprende además regiones de entramado, entre las que la HFR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 o 7, la HFR2 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 28-34, la HFR3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 63-68, y la HFR4 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 84 y 86-89.

En una realización preferida de la presente invención, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 150-157 y las SEQ ID NO: 159-165. Véase la Tabla b siguiente para consultar los detalles.

Tabla b. La región variable de cadena pesada del anticuerpo dirigido contra CLDN18.2

SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes
150	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSINNDG SSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGN YERDYWGQ GTLVTVSS
151	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
152	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYVVRQVPGKGLVWVSHINSDG STTQYADSVKGRFTISRDNAMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD F PVLGGSHFDFQH WGQGTLVTVSS
153	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYWMHWVRQVPGKGLVLSRISSDGN YTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDMLTGY PVRGQ GTTVTVSS
154	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGRGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDMLTGY PVRG

		QGTMTVTVSS
5	155	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTMVTVSS
	156	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPVRGQ GATVTVSS
10	157	EVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIGYDG RNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMDNLRAEDTALYYCARHFPSPGTTDTFDIR GPGTMTVTVSS
	159	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINFDS SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
15	160	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSAG SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
	161	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIDSRG SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
20	162	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSDA SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
25	163	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTG SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS
	164	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINPLGS TTQYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFPVLGGSHFDFQH WGQGTTLTVSS
30	165	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINHDS SRTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSS

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada. Más preferentemente, la región constante de cadena pesada se selecciona de hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4, y una variante de estas. Incluso más preferentemente, la región constante de cadena pesada es hlgG1.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo completo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un scFv, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de cadena pesada o un anticuerpo monodominio, o un anticuerpo monoclonal o policlonal preparado a partir de los anticuerpos anteriores.

- 5 En una realización más preferida de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monodominio que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 182–189 y las SEQ ID NO: 191–197. Véase la Tabla c siguiente para consultar los detalles.

Tabla c. La cadena pesada del anticuerpo dirigido contra CLDN18.2

10	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes
15	182	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSINND GSSTRYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGNYERDYW GQGTLLTVSSGQAGQEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	183	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSD GSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRG QGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
25	184	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINSD GSTTQYADSVKGRFTISRDNANKNMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFPVLGGSHFDF QHWGQGTLLTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	185	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYWMHWVRQVPGKGLVLSRISSDGN YTSYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDMLTGYPVRG QGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV

		VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
5	186	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPGRGLVWVSRINSD GSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYLCARGEDHDMLTGYPVR GQGTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
10	187	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYWMHWVRQVPKGKGLVWVSRINSD GSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRG QGTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
15	188	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSD GSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIVR GQGATVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
20	189	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIGYDG RNKYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCARHFPSLPGTTDTFDI RGP GTMTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	191	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMHWVRQVPKGKGLVWVSRINFDS SRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVTSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
30		
35		

		KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
5	192	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSAG SRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
10	193	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIDSR GSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRG QGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
15	194	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISDA SRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
20	195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTG SRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQ GTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
25	196	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWRQVPGKGLVWVSHINPLG STTQYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFFVLGGSHDFDQ HWGQGTLVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
30		
35		

	YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5 197	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWRQVPGKGLVWVSRINHDSSRTIYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 En la presente invención, un “fragmento Fab” consiste en una cadena ligera, y CH1 y la región variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula de Fab no puede formar enlaces disulfuro con otra molécula de la cadena pesada. Una región “Fc” contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH1 y CH2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos mediante dos o más enlaces disulfuro y

15 la interacción hidrófoba de los dominios CH3. Un “fragmento Fab” contiene una cadena ligera y parte de una cadena pesada que comprende el dominio VH y el dominio CH1, y la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se pueden formar enlaces disulfuro intercatenarios entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para proporcionar una molécula de F(ab')₂. Un “fragmento F(ab')₂” contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que

20 comprenden parte de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre las dos cadenas pesadas. Por tanto, un fragmento F(ab')₂ consiste en dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. El término “Fv” se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, pero que

25 carece de la región constante.

En la presente invención, el scFv (fragmento de anticuerpo monocatenario) puede ser un anticuerpo monocatenario convencional en la técnica, que comprende una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y un péptido corto de 15–20 aminoácidos. En el scFv, los dominios VL y VH se emparejan para formar una molécula

30 monovalente a través de un conector que les permite producir una única cadena polipeptídica [véanse, p. ej., Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)]. Tales moléculas de scFv pueden tener una estructura general: NH₂-VL-conector-VH-COOH o NH₂-VH-conector-VL-COOH. Un conector apropiado de la técnica anterior consiste en secuencias de aminoácidos G₄S repetidas o una variante de estas.

35 Por ejemplo, se pueden utilizar conectores que tienen la secuencia de aminoácidos (G₄S)₄ o (G₄S)₃, pero también se puede utilizar una variante de estas.

El término “anticuerpo multiespecífico” se utiliza en su sentido más amplio para que abarque anticuerpos con especificidad para múltiples epítomos. Estos anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a: un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), teniendo la unidad VH-VL especificidad para múltiples epítomos; un anticuerpo que tiene dos o más regiones VL y VH, uniéndose cada unidad VH-VL a una diana diferente o un epítopo diferente de la misma diana; un anticuerpo que tiene dos o más regiones variables independientes, uniéndose cada región variable independiente a una diana diferente o un epítopo diferente de la misma diana; anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos, triacuerpos, fragmentos de anticuerpo unidos entre sí covalentemente o no covalentemente, y similares.

El anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal o mAb o Ab de la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una única línea celular clonal, que no se limita a líneas celulares clonales eucariotas, procariotas o fágicas.

En la presente invención, el “anticuerpo de cadena pesada”, denominado también HCAb, se refiere a un anticuerpo que comprende solamente una región variable de cadena pesada (VHH), y dos regiones CH2 y CH3 convencionales.

En la presente invención, el “anticuerpo monodominio”, denominado también “nanocuerpo”, se refiere a una estructura VHH clonada a partir de un anticuerpo de cadena pesada. Es la unidad más pequeña que se sabe que es capaz de unirse a un antígeno diana.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un segundo aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región funcional proteínica dirigida contra CD3 y una segunda región funcional proteínica dirigida contra CLDN18.2;

la primera región funcional proteínica está en forma de un Fab y la segunda región funcional proteínica está en forma de VH y comprende preferentemente 2 o 3 VH; cuando la segunda región funcional proteínica comprende 3 VH unidos en serie, la primera región funcional proteínica y la segunda región funcional proteínica se unen cada una a una cadena doble de Fc; cuando la segunda región funcional proteínica comprende 2 VH unidos en serie, la primera región funcional proteínica y la segunda región funcional proteínica se unen cada una a una cadena doble de Fc; cuando la segunda región funcional proteínica comprende 3 VH y uno de los 3 VH se une a la primera región funcional proteínica, los dos VH restantes se unen en serie, y la primera región funcional proteínica y los dos VH unidos en serie de la segunda región funcional proteínica se unen cada uno a una cadena doble de Fc;

como alternativa, la primera región funcional proteínica está en forma de un Fab y la segunda región funcional proteínica está en forma de un HCAb;

como alternativa, la primera región funcional proteínica está en forma de un Fab y la segunda región funcional proteínica está en forma de un VH-HCAb, comprendiendo la segunda región funcional proteínica preferentemente un total de 4 VH.

En la presente invención, la “primera” y “segunda” en la primera región funcional proteínica y la segunda región funcional proteínica no tienen significado práctico, y se utilizan solamente para distinguir dominios de unión al antígeno para dianas diferentes. Una región funcional proteínica puede comprender una pluralidad de dominios de unión al antígeno en la misma forma o formas diferentes; los dominios de unión al antígeno de regiones funcionales proteínicas diferentes pueden estar unidos operativamente entre sí, y diferentes dominios de unión al antígeno de la misma región funcional proteínica puede que no estén unidos entre sí.

Por ejemplo, en la presente invención, la primera región funcional proteínica puede ser un dominio de unión al antígeno dirigido contra CD3 y la segunda región funcional proteínica puede ser un dominio de unión al antígeno dirigido contra CLDN18.2.

En una realización preferida de la presente invención, la segunda región funcional proteínica comprende una región variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde la HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 16–18, la HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 42–46 y las SEQ ID NO: 48–54, y la HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 77–82.

Más preferentemente, la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 42 y la SEQ ID NO: 77, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 44 y la SEQ ID NO: 79, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 48 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 50 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos como se exponen en la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 52 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente; o la HCDR1, la HCDR2 y la HCDR3 comprenden secuencias de aminoácidos

10

35

5		3							
	5	PR00539 8, PR00708 1	16	GFTFSSY	48	NFDSSR	78	GEDHDILTGYPI	
	6	PR00539 9, PR00707 9	16	GFTFSSY	49	SSAGSR	78	GEDHDILTGYPI	
10	7	PR00540 1, PR00708 0	16	GFTFSSY	50	DSRGSR	78	GEDHDILTGYPI	
15	8	PR00541 1, PR00629 2, PR00708 3, PR00629 3	16	GFTFSSY	51	SSDASR	78	GEDHDILTGYPI	
20		9	PR00542 2	16	GFTFSSY	53	NPLGST	79	DFPVLGGSHFDF QH
25		10	PR00708 2	16	GFTFSSY	54	NHDSSR	78	GEDHDILTGYPI

Incluso más preferentemente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 150–152 y las SEQ ID NO: 159–165, todas las cuales se han enumerado en la Tabla b.

En una realización específica de la presente invención, la primera región funcional proteínica comprende una región variable de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se exponen en la SEQ ID NO: 101, la SEQ ID NO: 116 y la SEQ ID NO: 131, respectivamente, y una región variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se exponen en la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 38 y la SEQ ID NO: 72, respectivamente.

Preferentemente, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 149 o la SEQ ID NO: 144 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 168.

La secuencia de aminoácidos de la primera región funcional proteínica anterior se muestra a continuación en la Tabla e.

Tabla e. Las secuencias de aminoácidos relacionadas con la primera región funcional proteínica del anticuerpo biespecífico

10	Primera región funcional proteínica	SEQ ID NO:	Secuencias correspon- dientes	SEQ ID NO:	Secuencias correspon- dientes	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes
15	HCDR de la región variable de cadena pesada	11	GFTFSTY	38	RSKYNNYA	72	HGNFGNSYVSWFAY
20	LCDR de la región variable de cadena ligera	101	RSSTGAVTT SNYAN	116	GTNKRAP	131	ALWYSNLWV
25	Primera región funcional proteínica	SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes				
30	Región variable de cadena pesada	144	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL EWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAED TAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS				
		149	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGL EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS				
35	Región variable de cadena ligera	168	QAVVTQEPLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQA PRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVL				

Preferentemente, el anticuerpo biespecífico comprende tres cadenas polipeptídicas en las siguientes formas:

dos extremos N del Fc se unen al Fab y al VH, respectivamente; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula:
 5 VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3 o VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CD3}-CH1-bisagra-CH2-CH3 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3}-CL;

como alternativa, un extremo C del HCAb se une a un VH o VL del Fab;
 10 preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3-VH_{CD3}-CH1 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3}-CL; como alternativa, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula:
 15 VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3-VL_{CD3}-CL y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CD3}-CH1; como alternativa, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula:
 20 VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3-VH_{CD3}-CH1 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3}-CL; como alternativa, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula:
 25 VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3-VL_{CD3}-CL y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CD3}-CH1;

como alternativa, el extremo N de la cadena pesada del Fab se une a un VH_{CLDN18.2}, el extremo C de la cadena pesada se une a un extremo N del Fc y el extremo C de los VH unidos en serie se une al otro extremo N del Fc; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula:
 30 VH_{CLDN18.2}-VH_{CLDN18.2}-bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CLDN18.2}-VH_{CD3}-CH1-bisagra-CH2-CH3 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3}-CL.

Más preferentemente, diferentes unidades funcionales tales como VH, CH2-CH3 y VL se unen operativamente mediante péptidos conectores que comprenden preferentemente una
 35 secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 244–248, preferentemente la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 246. Véase la Tabla f para consultar los detalles.

Tabla f. Secuencias de los péptidos conectores

SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes	Nombres
244	GGGGS	GS_5
245	GGGGS GGGGS	GS_10
246	GGGGS GGGGS GGGGS	GS_15
247	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	GS_20
248	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS	GS_25

En una realización de la presente invención, dos extremos N del Fc se unen al Fab y al VH, respectivamente; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3 o $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CD3} -CH1-bisagra-CH2-CH3 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3} -CL; véanse las estructuras (1) y (7) de la FIG. 4 para consultar ejemplos específicos;

como alternativa, un extremo C del HCAb se une a un VH o VL del Fab; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3-péptido conector- VH_{CD3} -CH1 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3} -CL; como alternativa, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3-péptido conector- VL_{CD3} -CL y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VH_{CD3} -CH1; véanse las estructuras (2) y (3) de la FIG. 4 para consultar ejemplos específicos;

como alternativa, un extremo C del VH-HCAb se une a un VH o VL del Fab; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3-péptido conector- VH_{CD3} -CH1 y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: VL_{CD3} -CL; como alternativa, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra-CH2-CH3-péptido conector- VL_{CD3} -CL y una tercera cadena

polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CD3}-CH1$; véanse las estructuras (4) y (5) de la FIG. 4 para consultar ejemplos específicos;

como alternativa, el extremo N de la cadena pesada del Fab se une a un $VH_{CLDN18.2}$, el extremo C de la cadena pesada se une a un extremo N del Fc y el extremo C de los VH unidos en serie se une al otro extremo N del Fc; preferentemente, el anticuerpo biespecífico tiene una primera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CLDN18.2}$ -bisagra- $CH2-CH3$, una segunda cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VH_{CLDN18.2}$ -péptido conector- $VH_{CD3}-CH1$ -bisagra- $CH2-CH3$ y una tercera cadena polipeptídica como se muestra en la fórmula: $VL_{CD3}-CL$; véase la estructura (6) de la FIG. 4 para consultar un ejemplo específico.

En una realización específica de la presente invención, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 214, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 219, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 220, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 221, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 222, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 223, la segunda cadena polipeptídica

comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

5 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 224, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

10 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 225, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

15 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 226, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

20 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 227, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 228 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

25 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 227, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 230 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 229;

30 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 219, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 231 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

35 como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 219, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 232 y la tercera

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 234, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 213 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200:

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 221, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 209 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200:

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 236, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 237 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 238, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200:

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 239, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 240, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 241, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 242, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200;

como alternativa, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 243, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 235 y la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 200.

Se muestra información sobre las secuencias en la realización específica anterior en la Tabla g siguiente.

Tabla g. Información sobre las secuencias de las cadenas polipeptídicas del anticuerpo específico

SEQ ID NO:	Secuencias correspondientes
200	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRA PWTPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

5	209	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	213	EVQLVES GGGLVQP GGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	214	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLEWVSYINNDG SSTRYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTEAPPYGNRYERDYWGQ GTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSY WMHWVRQAPGKGLEWVSYINNDGSSTRYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRA EDTAVYYCTEAPPYGNRYERDYWGQGTLVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	219	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	220	EVQLVES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINSDG STTQYADSVKGRFTISRDNANMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFFVLGGSHFDFQH

5		WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYWMYVWRQVPGKGLVWVSHNSDGTSTQYADSVKGRFTISRDNAMLYLQMNS LRAEDTAVYYCARDPVLGGSHFDQHWGQGTLVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	221	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTGS RTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRISSTGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	222	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINFDS RTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRINFDSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	223	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISAGS RTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRISAGSRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	224	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIDSRG SRTIYADSVKGRFTISRDNAMNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG

5		TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQVPGKGLVWVSRIDSRGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	225	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISDAS RTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRISDASRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	226	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINPLGS TTQYADSVKGRFTISRDNANMLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDFPVLGGSHFDFQHW GQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYWMYWVRQVPGKGLVWVSHINPLGSTTQYADSVKGRFTISRDNANMLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDFPVLGGSHFDFQHWGQGT LVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	227	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
35	228	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

5		CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSRTEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRTISRDDSKSTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
10	229	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYN NYATYYADSVKDRTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
15	230	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSRTEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYA TYYADSVKDRTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
20	231	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYW MHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSRTEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYA TYYADSVKDRTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWG QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
25	232	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG

5		SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSRTQAV VTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPW
10		TPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
15		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYA MNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG 233 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS 20 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINSDGSRTIYADSVKG 30 234 RFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP 35 GK
	235	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSTYAMNHWVRQASGKGLEWVGRIRSKYN

5		NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	236	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISDAS RTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRISDASRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	237	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNHWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	238	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISSTGS RTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRISSTGSRTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30		
35	239	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRISAGS RTIYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGT TVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM

5		HWVRQVPGKGLVWVSRISSAGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPEAPEAAGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	240	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRIDSRG SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWRQVPGKGLVWVSRIDSRGSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPEAPEAAGAPSV FLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	241	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINFDS RTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM HWVRQVPGKGLVWVSRINFDSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPEAPEAAGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINHDS SRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWRQVPGKGLVWVSRINHDSRTIYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPEAPEAAGAPSV FLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30		
35	243	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVCRISDAS RTIYADSVKGRFTCSRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQG TTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW

5	MHWVRQVPGKGLVWVCRISSDASRTIYADSVKGRFTCSRDNANTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARGEDHDILTGYPIRGQGTTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
---	--

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un tercer aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

El método de preparación del ácido nucleico es un método de preparación convencional en la técnica, y comprende preferentemente los siguientes pasos: obtener una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anterior mediante tecnología de clonación de genes u obtener una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anterior mediante la síntesis de secuencias completas artificiales.

Los expertos en la técnica saben que se pueden introducir sustituciones, deleciones, alteraciones, inserciones o adiciones de forma apropiada en la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anterior para proporcionar un homólogo polinucleotídico. El homólogo polinucleotídico de la presente invención se puede producir mediante la sustitución, delección o adición de una o más bases de un gen que codifica la secuencias del anticuerpo dentro de un intervalo en el que se conserva la actividad del anticuerpo.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un cuarto aspecto de la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico aislado de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención. El vector de expresión recombinante se puede obtener utilizando métodos convencionales en la técnica, es decir, uniendo la molécula de ácido nucleico de la presente invención a diferentes vectores de expresión. El vector de expresión es cualquier vector de expresión convencional en la técnica, siempre que pueda portar la molécula de ácido nucleico mencionada anteriormente.

Preferentemente, el vector de expresión recombinante es un plásmido, un cósmido, un fago o un vector vírico, en donde el vector vírico es preferentemente un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector vírico adenoasociado.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un quinto aspecto de la presente invención proporciona un transformante que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención en una célula hospedadora;

preferentemente, la célula hospedadora es una célula BL21, TG1 de *E. coli* o una célula CHO-K1.

El transformante de expresión recombinante se puede preparar utilizando métodos convencionales en la técnica, p. ej., transformando el vector de expresión recombinante anterior en una célula hospedadora. La célula hospedadora es cualquier célula hospedadora convencional en la técnica, siempre que pueda permitir la replicación estable del vector de expresión recombinante anterior y el ácido nucleico portado se pueda expresar de forma eficiente. Preferentemente, la célula hospedadora es una célula BL21 o TG1 de *E. coli* (que expresa un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo Fab), o una célula CHO-K1 (que expresa un anticuerpo IgG completo). El transformante de expresión recombinante preferido de la presente invención se puede obtener transformando el plásmido de expresión recombinante mencionado anteriormente en una célula hospedadora. El método de transformación es un método de transformación convencional en la técnica, preferentemente un método de transformación química, un método de choque térmico o un método de transformación eléctrica.

En la presente invención, el anticuerpo dirigido contra CLDN18.2 se puede utilizar para preparar un receptor antigénico quimérico (CAR, por sus siglas en inglés) o similar a fin de modificarlo sobre células tales como linfocitos T o linfocitos NK. Por tanto, un sexto aspecto de la presente invención proporciona un receptor antigénico quimérico (CAR) que comprende el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención.

Por ejemplo, el receptor antigénico quimérico puede comprender la siguiente estructura: (a) un dominio de unión extracelular scFv que reconoce específicamente CLDN18.2; (b) un dominio de bisagra; (c) un dominio transmembranario; (d) un dominio intracelular coestimulador; y (e) un dominio de señalización; en donde el dominio de unión extracelular comprende el anticuerpo dirigido contra CLDN18.2 de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un séptimo aspecto de la presente invención proporciona una célula modificada genéticamente que comprende el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. Preferentemente, la célula modificada genéticamente es una célula eucariota, preferentemente una célula humana aislada, y más preferentemente una célula inmunitaria tal como un linfocito T o un linfocito NK.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un octavo aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo biespecífico que comprende cultivar el transformante de acuerdo con el quinto aspecto de la presente invención y obtener el anticuerpo o el anticuerpo biespecífico a partir del cultivo.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un noveno aspecto de la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) que comprende un agente citotóxico y el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención; preferentemente, el agente citotóxico es MMAF o MMAE.

El método de preparación del conjugado de anticuerpo-fármaco puede ser un método convencional en la técnica y preferentemente el método de preparación descrito en Doronina, 2006, *Bioconjugate Chem.* 17, 114–124. Preferentemente, el método de preparación produce conjugados de anticuerpo-fármaco con una fracción de conjugación baja (LCF, por sus siglas en inglés) mínima de menos del 10%.

El conjugado de anticuerpo-fármaco puede estar presente en cualquier forma física conocida en la técnica, preferentemente como una solución transparente.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un décimo aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además uno o más del grupo que consiste en un agente hormonal, un agente dirigido a una molécula de bajo peso molecular, un inhibidor del proteasoma, un agente para la obtención de imágenes, un agente de diagnóstico, un agente quimioterápico, un fármaco oncolítico, un agente citotóxico, una citocina, un activador de una molécula coestimuladora, un inhibidor de una molécula inhibidora y una vacuna.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un undécimo aspecto de la presente invención proporciona el uso del anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada con CD3 y/o CLDN18.2.

la enfermedad es preferentemente cáncer, en donde el cáncer es preferentemente cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de endometrio, cáncer renal, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer esofágico, cáncer cervicouterino, tumor de cabeza y cuello, colangiocarcinoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de vejiga, sarcoma o cáncer colorrectal; preferentemente, el cáncer es cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de endometrio, cáncer renal o colangiocarcinoma; más preferentemente, el cáncer es cáncer de mama.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un decimosegundo aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende el anticuerpo de acuerdo con el primer

aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el receptor antigénico quimérico de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, la célula modificada genéticamente de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, o el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención;

preferentemente, el kit comprende además (i) un dispositivo para administrar el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este o el conjugado de anticuerpo-fármaco o la composición farmacéutica; y/o (ii) instrucciones.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un decimotercer aspecto de la presente invención proporciona un kit de piezas que comprende un kit A y un kit B, en donde:

el kit A comprende el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el receptor antigénico quimérico de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, la célula modificada genéticamente de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención y/o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención;

el kit B comprende otros anticuerpos antitumorales o una composición farmacéutica que comprende los otros anticuerpos antitumorales y/o uno o más del grupo que consiste en un agente hormonal, un agente dirigido a una molécula de bajo peso molecular, un inhibidor del proteasoma, un agente para la obtención de imágenes, un agente de diagnóstico, un agente quimioterápico, un fármaco oncolítico, un agente citotóxico, una citocina, un activador de una molécula coestimuladora, un inhibidor de una molécula inhibidora y una vacuna.

El kit A y el kit B se pueden utilizar de forma simultánea, o el kit A se puede utilizar antes de utilizar el kit B, o el kit B se puede utilizar antes de utilizar el kit A. La secuencia de uso se puede determinar según los requisitos concretos en una aplicación específica.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un decimocuarto aspecto de la presente invención proporciona un método para diagnosticar, tratar y/o prevenir una enfermedad o trastorno mediado por CLDN18.2 que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el receptor antigénico quimérico de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención, o tratar a un paciente que lo necesita utilizando el kit de piezas de acuerdo con el decimotercer aspecto de la presente invención.

Preferentemente, la enfermedad o trastorno es un tumor, preferentemente un tumor positivo para CLDN18.2, y más preferentemente cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, melanoma, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma bronquial, glioma y/o leucemia.

El “positivo para CLDN18.2” utilizado en la presente invención se refiere a la sobreexpresión de la proteína CLDN18.2, p. ej., las líneas celulares NUGC4_D8 positivas para CLDN18.2; de lo contrario, se denomina “negativo para CLDN18.2”.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un decimoquinto aspecto de la presente invención proporciona un método de inmunodetección o determinación de CLDN18.2 que comprende utilizar el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con segundo aspecto de la presente invención, el receptor antigénico quimérico de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención. Preferentemente, la detección es con fines terapéuticos y/o que no son de diagnóstico.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, un decimosexto aspecto de la presente invención proporciona una politerapia que comprende administrar a un paciente que lo necesita el anticuerpo de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención o el anticuerpo biespecífico de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, el receptor antigénico quimérico de acuerdo con el sexto aspecto de la presente invención, el conjugado de anticuerpo-fármaco de acuerdo con el noveno aspecto de la presente invención o la composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto de la presente invención y un segundo agente terapéutico; el segundo agente terapéutico comprende preferentemente otros anticuerpos antitumorales o una composición farmacéutica que comprende los otros anticuerpos antitumorales, y/o uno o más del grupo que consiste en un agente hormonal, un agente dirigido a una molécula de bajo peso molecular, un inhibidor del proteasoma, un agente para la obtención de imágenes, un agente de diagnóstico, un agente quimioterápico, un fármaco oncolítico, un agente citotóxico, una citocina, un activador de una molécula coestimuladora, un inhibidor de una molécula inhibidora y una vacuna.

En la presente solicitud, las secuencias de aminoácidos de las CDR enumeradas se muestran todas ellas de acuerdo con el esquema de Chothia (las secuencias en las reivindicaciones de la presente invención también se muestran de acuerdo con el esquema de Chothia). Sin embargo, los expertos en la técnica saben de sobra que las CDR de un anticuerpo se pueden definir en la técnica utilizando diversidad de métodos, tales como el esquema de Kabat basado en la variabilidad de las secuencias (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Institutos Nacionales de Salud (Estados

Unidos), Bethesda, Maryland (1991)) y el esquema de Chothia basado en la ubicación de las regiones de bucle estructural (véase *J Mol Biol* 273: 927–48, 1997). En la presente solicitud, también se puede utilizar el esquema combinado que comprende el esquema de Kabat y el esquema de Chothia para determinar los residuos aminoacídicos en una secuencia de dominio variable. El esquema combinado combina el esquema de Kabat con el esquema de Chothia para obtener un intervalo más grande. Véase la Tabla 1 para consultar los detalles. Los expertos en la técnica entenderán que, a menos que se especifique otra cosa, los términos “CDR” y “región determinante de la complementariedad” de un anticuerpo dado o una región (p. ej., región variable) de este se interpretan de modo que abarquen regiones determinantes de la complementariedad como se definen según uno cualquiera de los esquemas conocidos anteriores que se describen la presente. Aunque el alcance reivindicado en las reivindicaciones de la presente invención es las secuencias mostradas basadas en el esquema de Chothia, las secuencias de aminoácidos correspondientes a los otros esquemas que definen CRD también entrarán dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 1. El esquema de definición para las CDR del anticuerpo de la presente invención (véase <http://bioinf.org.uk/abs/>)

	Kabat	Chothia	Combinado
VL CDR1	L24--L34	L24--L34	L24-L34
VL CDR2	L50--L56	L50--L56	L50-L56
VL CDR3	L89--L97	L89--L97	L89-L97
VH CDR1	H31--H35	H26--H32	H26-H35
VH CDR2	H50--H65	H52--H56	H50-H65
VH CDR3	H95--H102	H95--H102	H95-H102

En el esquema de Chothia, Laa-Lbb puede referirse a una secuencia de aminoácidos desde la posición aa hasta la posición bb comenzando en el extremo N de la cadena ligera del anticuerpo; y Haa-Hbb puede referirse a una secuencia de aminoácidos desde la posición aa hasta la posición bb comenzando en el extremo N de la cadena pesada del anticuerpo. Por ejemplo, L24-L34 puede referirse a la secuencia de aminoácidos desde la posición 24 hasta la posición 34 de acuerdo con el esquema de Chothia comenzando en el extremo N de la cadena ligera del anticuerpo; H26-H32 puede referirse a la secuencia de aminoácidos desde la posición 26 hasta la posición 32 de acuerdo con el esquema de Chothia comenzando en el extremo N de la cadena pesada del anticuerpo. Los expertos en la técnica saben de sobra que hay posiciones en las que hay sitios de inserción presentes al numerar las CDR con el esquema de Chothia.

En la presente invención, a menos que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tienen los significados que entienden generalmente los

expertos en la técnica. Además, las operaciones de laboratorio de cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos e inmunología utilizadas son los procedimientos rutinarios de uso común en los campos correspondientes. Sin embargo, con el fin de comprender mejor la presente invención, a continuación se proporcionan las definiciones y explicaciones de los términos relevantes.

Los expertos en la técnica conocen los códigos de tres letras y códigos de una letra para los aminoácidos utilizados en la presente invención, o se describen en *J. Biol. Chem*, 243, p3558 (1968).

Tal como se utiliza en la presente, se pretende que el término “incluir/incluye/que incluye” o “comprender/comprende/que comprende” signifique que una composición y un método incluyen los elementos descritos pero no excluyen otros elementos; pero el caso de “consistir/consiste/que consiste en” también se incluye según dicte el contexto.

El término “CLDN18.2” incluye isotipos, CLDN18.2 de mamífero (p. ej., humana), especies homólogas de CLDN18.2 humana y análogos que comprenden al menos un epítipo común con CLDN18.2. La secuencia de aminoácidos de CLDN18.2 (p. ej., CLDN18.2 humana) se conoce en la técnica, tal como se muestra en la base de datos del NCBI.

El término “CLDN18.1” incluye isotipos, CLDN18.1 de mamífero (p. ej., humana), especies homólogas de CLDN18.1 humana y análogos que comprenden al menos un epítipo común con CLDN18.1. La secuencia de aminoácidos de CLDN18.1 (p. ej., CLDN18.1 humana) se conoce en la técnica, tal como se muestra en la base de datos del NCBI.

El término “epítipo” se refiere a restos de un antígeno (p. ej., CLDN18.2 humana) que interactúan específicamente con una molécula de anticuerpo. El término “competitiva” en la presente invención se refiere a la capacidad de una molécula de anticuerpo de interferir en la unión de una molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2 a una diana (p. ej., CLDN18.2 humana). La interferencia en la unión puede ser directa o indirecta (p. ej., a través de la modulación alostérica de una molécula de anticuerpo o diana). Los ensayos de unión competitiva (p. ej., ensayos FACS, ensayos ELISA o BIACORE) se pueden utilizar para determinar la medida en que una molécula de anticuerpo es capaz de interferir en la unión de otra molécula de anticuerpo con su diana.

El término “anticuerpo” utilizado en la presente invención incluye una inmunoglobulina, que es una estructura catenaria tetrapeptídica formada mediante la conexión entre dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas por enlaces disulfuro intercatenarios. Las inmunoglobulinas difieren en la composición de aminoácidos y la disposición de sus regiones constantes de cadena pesada y, por lo tanto, en su antigenicidad. Por consiguiente, las inmunoglobulinas se pueden clasificar en cinco clases o isotipos de inmunoglobulinas, en concreto, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, siendo sus cadenas pesadas correspondientes las cadenas μ , δ , γ , α y ϵ , respectivamente. Las Ig de la misma clase se

pueden dividir en subclases diferentes de acuerdo con las diferencias en la composición de aminoácidos de las regiones bisagra, y el número y la ubicación de los enlaces disulfuro en las cadenas pesadas; por ejemplo, las IgG se pueden dividir en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las cadenas ligeras se clasifican en cadenas κ o λ por la diferencia en las regiones constantes.

5 Cada una de las cinco clases de Ig pueden tener una cadena κ o una cadena λ .

En la presente invención, la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la presente invención puede comprender además una región constante de cadena ligera que comprende una cadena κ o λ humana, o una variante de estas. En la presente invención, la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la presente invención puede comprender además una región constante de cadena pesada que comprende IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas, o una variante de estas.

Las secuencias de aproximadamente 110 aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo próximas al extremo N varían considerablemente y, por tanto, se denominan regiones variables (regiones V); las secuencias de aminoácidos restantes próximas al extremo C son relativamente estables y, por tanto, se denominan regiones constantes (regiones C). Las regiones variables comprenden 3 regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés) y 4 regiones de entramado (FWR, por sus siglas en inglés) con secuencias relativamente conservadoras. Las 3 regiones hipervariables determinan la especificidad del anticuerpo y, por tanto, también se conocen como regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

20 Cada región variable de cadena ligera (VL) o región variable de cadena pesada (VH) consiste en 3 regiones CDR y 4 regiones FWR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 y FWR4. Las 3 regiones CDR de la cadena ligera se refieren a LCDR1, LCDR2 y LCDR3; las 3 regiones CDR de la cadena pesada se refieren a HCDR1, HCDR2 y HCDR3.

25 En las cadenas ligeras y cadenas pesadas, la región variable y la región constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada comprende además una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada consiste en una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada consiste en 3 dominios (CH1, CH2 y CH3). Cada cadena ligera consiste en una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera consiste en un dominio CL. La región constante del anticuerpo puede mediar la unión de inmunoglobulinas a tejidos hospedadores o factores, incluida la unión de diferentes células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) al primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones hipervariables (denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR)), entre las que se distribuyen regiones conservadoras denominadas regiones de entramado (FWR). Cada VH y VL consiste en 3 CDR

35

y 4 FWR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FWR1, CDR1, FWR2, CDR2, FWR3, CDR3 y FWR4. Las regiones variables correspondientes (VH y VL) de cada cadena pesada/cadena ligera forman un sitio de unión del anticuerpo, respectivamente. En particular, la cadena pesada puede comprender también 3 o más CDR, tales como 6, 9 o 12 CDR. Por ejemplo, en el anticuerpo biespecífico de la presente invención, la cadena pesada puede ser un ScFv con el extremo N de la cadena pesada de anticuerpo IgG unido a otro anticuerpo y, en este caso, la cadena pesada comprende 9 CDR.

El término “anticuerpo humano” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. El anticuerpo humano de la presente invención puede incluir residuos aminoacídicos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano” no incluye anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, en secuencias estructurales humanas (es decir, “anticuerpos humanizados”).

Tal como se utiliza en la presente, el término “específico” con respecto a un anticuerpo significa que un anticuerpo reconoce un antígeno específico pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie puede que también se una al antígeno de una o más especies. Sin embargo, tal reactividad cruzada entre especies no cambia de por sí la clasificación de los anticuerpos por su especificidad. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno puede que también se una al antígeno en formas alélicas diferentes. Sin embargo, tal reactividad cruzada no cambia de por sí la clasificación de los anticuerpos por su especificidad. En algunos casos, el término “especificidad” o “unión específica” se puede utilizar para referirse a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda sustancia química, lo cual quiere decir que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (p. ej., un determinante antigénico o epítipo) en la sustancia química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une generalmente a una estructura proteínica particular en lugar de a una proteína. Si un anticuerpo es específico para un epítipo “A”, entonces en una reacción que contenga “A” marcado y el anticuerpo, la presencia de una molécula que contenga el epítipo A (o A sin marcar, libre) reducirá la cantidad de A marcado al que se une el anticuerpo.

El término “receptor antigénico quimérico” o “CAR” utilizado en la presente incluye dominios extracelulares (dominios de unión extracelular), dominios de bisagra, dominios transmembranarios (regiones transmembranarias) capaces de unirse a antígenos y polipéptidos lo cual hace que una señal citoplásmica pase a un dominio (es decir, un dominio de señal intracelular). El dominio de bisagra puede considerarse como una parte para

proporcionar flexibilidad a una región de unión al antígeno extracelular. El dominio de señal intracelular se refiere a una proteína que transmite información a una célula a través de una vía de señalización determinada generando un segundo mensajero para regular la actividad de la célula o una proteína que actúa como un efector al corresponder a dicho mensajero. Genera una señal que puede fomentar la función efectora inmunitaria de una célula del CAR (p. ej., un linfocito T-CAR). El dominio de señal intracelular incluye un dominio de señalización y también puede incluir un dominio intracelular coestimulador derivado de una molécula coestimuladora.

“Homología”, “secuencia variante” o “mutación” se refiere a una similitud secuencial entre dos secuencias polinucleotídicas o entre dos secuencias polipeptídicas. Cuando las posiciones en dos secuencias comparadas están todas ellas ocupadas por la misma subunidad monomérica de aminoácido o base, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, las moléculas son homólogas en esa posición. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas que comparten las dos secuencias dividido por el número de las posiciones comparadas $\times 100\%$. Por ejemplo, cuando las secuencias se alinean de forma óptima, si 6 de 10 posiciones en dos secuencias coinciden o son homólogas, las dos secuencias son un 60% homólogas. En general, la comparación se realiza cuando dos secuencias alineadas proporcionan el mayor porcentaje de identidad. La “optimización” se refiere a una mutación que mantiene o mejora la unión de un anticuerpo a un antígeno. En la presente invención, se refiere a una mutación que mantiene, conserva o mejora la unión a CLDN18.2.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” (si son monocatenarios) se utilizan indistintamente en la presente invención. Los términos “ácido nucleico”, “secuencia de ácido nucleico”, “secuencia de nucleótidos” o “secuencia polinucleotídica” y “polinucleótido” se utilizan indistintamente.

El término “mutación” incluye sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos o nucleótidos. La “sustitución de aminoácidos” y “sustitución de aminoácidos conservadora” son el reemplazo de un residuo aminoacídico por otro residuo aminoacídico y el reemplazo por un residuo aminoacídico con cadenas laterales similares, respectivamente.

El “lentivirus” utilizado en la presente se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus y son capaces de infectar células que no están en división; son capaces de insertar una cantidad considerable de información genética en el ADN de una célula hospedadora y son, por tanto, uno de los métodos más eficaces de vectores de inserción de genes. El VIH, el VIS y el VIF son todos ellos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus proporcionan un medio para conseguir una transferencia de genes horizontal significativa in vivo.

El término “vector” utilizado en la presente es una composición que comprende un ácido nucleico aislado y es útil para insertar el ácido nucleico aislado en el interior de una célula. En la técnica se conocen muchos vectores. Estos incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfífilos, plásmidos y virus. Por tanto, el término “vector” incluye plásmidos o virus que se replican de forma autónoma. El término también se ha de interpretar que incluye compuestos no plasmídicos y no víricos que facilitan la transferencia de ácidos nucleicos a las células, tales como compuestos de polilisina y liposomas. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores retrovíricos, etc.

Las expresiones “célula” y “línea celular” utilizadas en la presente invención se utilizan indistintamente y todas estas designaciones incluyen la descendencia. El término “célula hospedadora” se refiere a una célula en la que se puede introducir un vector, que incluye, pero no se limita a, células procariotas tales como *E. coli*, células fúngicas tales como células de levadura o células de animales tales como fibroblastos, células CHO, células COS, células NSO, células HeLa, células BHK, células HEK 293 o células humanas.

El término “transfección” se refiere a la introducción de un ácido nucleico exógeno en una célula eucariota. La transfección se puede conseguir mediante diversidad de medios conocidos en la técnica, que incluyen la coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística.

El término “célula inmunitaria” se refiere a una célula que puede desencadenar una respuesta inmunitaria. La “célula inmunitaria” y otras variaciones gramaticales de esta pueden referirse a una célula inmunitaria de cualquier origen. La “célula inmunitaria” incluye, por ejemplo, los glóbulos blancos (leucocitos) y los linfocitos (linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés)) derivados de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) producidas en la médula ósea, y células derivadas de la médula ósea (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas). El término “célula inmunitaria” también puede referirse a una célula inmunitaria humana o no humana.

Tal como se utiliza en la presente, el término “linfocito T” se refiere a una clase de linfocitos que maduran en el timo. Los linfocitos T desempeñan un papel importante en la inmunidad celular y difieren de otros linfocitos (p. ej., linfocitos B) en que los receptores de los linfocitos T están presentes en la superficie celular. El “linfocito T” incluye todos los tipos de células inmunitarias que expresan CD3, que incluyen linfocitos T cooperadores (células CD4+), linfocitos T citotóxicos (células CD8+), linfocitos T citolíticos naturales, linfocitos T reguladores (Treg) y linfocitos γ - δ T. Las “células citotóxicas” incluyen linfocitos T CD8+, linfocitos citolíticos

naturales (NK) y neutrófilos, que son capaces de mediar una respuesta citotóxica. Tal como se utiliza en la presente, el término “linfocito NK” se refiere a una clase de linfocitos que se originan en la médula ósea y desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario innato. Los linfocitos NK proporcionan una respuesta inmunitaria rápida contra células infectadas por virus, células tumorales u otras células estresadas, incluso en ausencia de anticuerpos y complejos principales de histocompatibilidad sobre la superficie celular.

Por ejemplo, las células inmunitarias pueden provenir de la sangre, tales como linfocitos T autólogos, linfocitos T alogénicos, linfocitos NK autólogos y linfocitos NK alogénicos, o de líneas celulares, tales como líneas de linfocitos NK preparadas mediante la infección con el virus VEB, linfocitos NK obtenidos mediante la diferenciación inducida de células madre embrionarias e iPSC, así como líneas celulares NK92.

El término “opcional”, “opcionalmente”, “cualquiera” o “uno cualquiera de” significa que el evento o circunstancia descrito subsiguientemente puede ocurrir, pero no por fuerza, y que la descripción incluye casos donde el evento o circunstancia ocurre o no ocurre. Por ejemplo, “que comprende opcionalmente 1 región variable de cadena pesada de anticuerpo” significa que la región variable de cadena pesada de anticuerpo de una secuencia particular puede estar presente, pero no por fuerza. Tal como se utiliza en la presente, el “un” y uno/a” se utilizan en la presente invención para referirse a uno o más objetos gramaticales. A menos que se indique específicamente otra cosa en el contexto, el término “o” se utiliza en la presente invención con el significado de, y es intercambiable con, el término “y/o”. El “aproximadamente” significará, por lo general, un grado aceptable de error en la cantidad medida en vista la naturaleza o exactitud de la medición. Los grados de error a modo de ejemplo son normalmente con una diferencia máxima de un 10% y más normalmente con una diferencia máxima de un 5%. El método y la composición divulgados en la presente invención abarcan polipéptidos y ácidos nucleicos que tienen una secuencia especificada, una secuencia variante o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a esta, p. ej., una secuencia con una identidad de al menos el 85%, 90%, 95%, 99% o mayor respecto a la secuencia especificada. En el contexto de secuencias de aminoácidos, el término “sustancialmente idéntica” se utiliza en la presente invención para referirse a una primera secuencia de aminoácidos.

Tal como se utiliza en la presente, el término CE₅₀ se refiere a la concentración para el 50% del efecto máximo, es decir, la concentración que puede provocar el 50% del efecto máximo.

Tal como se utilizan en la presente, los términos “conjugado de anticuerpo-fármaco” y “ADC” se utilizan indistintamente.

La auristatina es un fármaco completamente sintético cuya fórmula estructural química es relativamente fácil de modificar para optimizar sus propiedades físicas y su capacidad de convertirse en fármaco. Los derivados de auristatina utilizados para la conjugación con

anticuerpos incluyen principalmente monometilauristatina E (MMAE) y monometilauristatina F (MMAF), en donde la primera se sintetiza añadiendo 2-amino-1-fenilpropil-1-ol al extremo C de un pentapéptido sintético derivado de un inhibidor de tubulina·polimerasa natural la dolastatina-10. La actividad inhibidora de MMAE contra diferentes líneas celulares tumorales humanas es menor de un nanomol. A fin de reducir la actividad citotóxica de MMAE, se añade una fenilalanina al extremo C de la dolastatina-10 en MMAF. La transitabilidad a través de la membrana celular de MMAF es baja debido al carboxilo introducido en la estructura. Por lo tanto, la bioactividad frente a células se reduce significativamente, pero la actividad inhibidora contra las células aumenta en gran medida después de la conjugación con un anticuerpo (documento US7750116).

En algunas realizaciones, un conjugado de anticuerpo-fármaco citotóxico o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de este comprende el anticuerpo de la presente invención conjugado con una o más moléculas maitansinoides. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que desactivan la tubulina inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Pat. de los EE.UU. N.º 3 896 111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microorganismos también producen maitansinoides, tales como maitansinol y vinagre de maitansinol C-3 (Pat. de los EE. UU. N.º 4 151 042). Los módulos de fármacos maitansinoides son módulos de fármacos interesantes en conjugados de anticuerpo-fármaco ya que: (i) son relativamente fáciles de preparar mediante fermentación o modificación química o derivatización del producto de la fermentación; (ii) se derivatizan fácilmente con grupos funcionales adecuados para la conjugación con anticuerpos a través de conectores que no son disulfuros; (iii) son estables en plasma; y (iv) son eficaces para diversidad de líneas celulares tumorales. Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como módulos de fármacos maitansinoides son muy conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos o producirse utilizando técnicas de ingeniería genética (véase Yu *et al.*, (2002) *PNAS* 99: 7968-7973). También se pueden preparar maitansinol y análogos de maitansinol sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos. Las realizaciones a modo de ejemplo de módulos de fármacos maitansinoides incluyen: DM1, DM3 y DM4, tal como se divulgan en la presente.

El método, la composición y la politerapia de la presente invención se pueden combinar con otros agentes activos o modalidades terapéuticas, comprendiendo el método administrar a un sujeto la molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2 de la presente invención en una cantidad que es eficaz para tratar o prevenir enfermedades (p. ej., cáncer), opcionalmente en combinación con uno o más inhibidores de PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, CTLA-4, anticuerpo contra Tim-3 (inmunoterapia) u otros anticuerpos para la terapia antitumoral, anticuerpos contra Her-2, EGFR, VEGF, VEGFR, etc., así como ADC (p. ej., T-DM1), anticuerpos biespecíficos,

agentes quimioterápicos, etc., y comprendiendo además administrar una molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2, un agente activo adicional o todos ellos en una cantidad o en una dosis que es más alta, más baja o igual a la cantidad o dosis de cada agente activo cuando se utiliza solo (p. ej., como una monoterapia). La cantidad o dosis del anticuerpo anti-CLDN18.2, el agente activo adicional o todos ellos administrada es, p. ej., al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50%, menor que la cantidad o dosis de cada agente activo cuando se utiliza solo (p. ej., como una monoterapia).

Además, tal como se describe en los ejemplos de la presente invención, el anticuerpo anti-CLDN18.2 y el conjugado con fármaco del anticuerpo contra CLDN18.2 se pueden unir a CLDN18.2 para inducir la apoptosis de las células diana (células tumorales), para inhibir el crecimiento de las células tumorales, y para aumentar los efectos de destrucción ADCC y CDC de las células efectoras sobre las células tumorales *in vivo*, para conseguir de este modo el objetivo de tratar a pacientes con cáncer. Por tanto, en ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CLDN18.2 y el conjugado con fármaco del anticuerpo contra CLDN18.2 descrito en la presente invención muestran los efectos antitumorales del anticuerpo de la presente invención, así como métodos para inhibir el crecimiento de las células tumorales que comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CLDN18.2 y el conjugado con fármaco del anticuerpo contra CLDN18.2 de la presente invención, a través de estos mecanismos. El método es adecuado para el tratamiento *in vivo* del cáncer. Para conseguir un efecto terapéutico específico deseado, la molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2 se puede administrar junto con otros anticuerpos. Al administrar el anticuerpo contra CLDN18.2 y el conjugado con fármaco del anticuerpo contra CLDN18.2 en combinación con uno o más agentes activos, la combinación se puede administrar en cualquier orden o de forma simultánea a un paciente con un tipo de cáncer, en particular, un paciente que padece un tumor con una expresión alta de CLDN18.2. En ciertos aspectos, se proporciona el tratamiento (p. ej., la reducción o la mejoría) de un síntoma o enfermedad hiperproliferativa (p. ej., cáncer) en un sujeto. El método comprende administrar a un sujeto uno o más anticuerpos anti-CLDN18.2 o conjugados con fármaco de los anticuerpos contra CLDN18.2 de la presente invención, ya sean solos o en combinación con otros agentes activos o modalidades terapéuticas.

La molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2, solo o combinado con otro agente inmunomodulador (p. ej., moléculas de anticuerpo anti-LAG-3, anti-Tim-3, anti-PD-L o anti-PD-L1 y anti-CTLA-4), se emplea para tratar el cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, cáncer ovárico, etc. La molécula de anticuerpo anti-CLDN18.2 se puede administrar en combinación con uno o más de: una estrategia inmunitaria, un fármaco dirigido (p. ej., un inhibidor de VEGF tal como un anticuerpo monoclonal contra VEGF); inhibidores de tirosina·cinasas VEGF tales como sunitinib, sorafenib y apatinib; inhibidores de

la ribointerferencia o inhibidores de mediadores posteriores de la señalización de VEGF, p. ej., inhibidores de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas en inglés).

Tal como se utilizan en la presente, se pretende que los términos “cáncer”, “paciente con cáncer” incluyan todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos que han experimentado una transformación maligna, independientemente de sus estadios o tipos histopatológicos de agresividad. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tumores sólidos, cáncer hemático, tumores de tejido blando y lesiones metastásicas.

Los ejemplos no limitantes de cánceres que se pueden tratar de forma adecuada utilizando el anticuerpo dirigido contra CLDN18.2 divulgado en la presente invención incluyen el cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer renal, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, glioma y/o leucemia y similares, o lesiones metastásicas de estos.

Las condiciones preferidas anteriores se pueden combinar de forma arbitraria para obtener realizaciones preferidas de la presente invención basándose en los conocimientos generales en la técnica.

Los reactivos y materiales de partida utilizados en la presente invención se comercializan.

Los efectos beneficiosos de la presente invención son los siguientes:

1. La presente invención describe anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2 con excelente afinidad, especificidad y actividad endocítica. El anticuerpo es un anticuerpo completamente humano nuevo que contiene una “cadena pesada” solamente con un peso molecular que es solo aproximadamente la mitad del de un anticuerpo IgG convencional. Debido a la ausencia de una cadena ligera, el anticuerpo se puede utilizar para el desarrollo de anticuerpos biespecíficos, y se evitan los problemas comunes de la discrepancia y la heterodimerización de la cadena ligera en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos. También presenta la posibilidad de desarrollarse en forma de ADC. En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo HCAb tiene una gran afinidad por las células tumorales que expresan CLDN18.2 de forma endógena y puede inducir una gran actividad endocítica en comparación con un análogo de IMAB362.

2. La presente invención también describe anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 con una actividad TDCC *in vitro* y un efecto farmacológico *in vivo* excelentes. El anticuerpo biespecífico de la presente invención tiene la actividad de unirse específicamente a CLDN18.2, y tiene un efecto de destrucción mejor sobre las células tumorales que un análogo de un anticuerpo biespecífico patentado de Amgen. En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo biespecífico tiene un fragmento Fc y, por tanto, retiene el efecto de unión del Fc a un FcRn; en cambio, se prefiere un Fc mutado para reducir la unión a un FcγR y de este modo la activación de linfocitos T inespecíficos provocada por el entrelazamiento de un

FcgR. Se optimiza la actividad del extremo CD3 de tal manera que se puede reducir la liberación de citocinas comunes en el CRS, tales como IL6 y TNF α . El extremo CLDN18.2 está en forma de VHH unidos en serie, lo cual evita el problema común de la discrepancia de las cadenas pesada y ligera, retiene la excelente hidrofilia y mejora la selectividad por las células tumorales con una expresión alta de CLDN18.2. El anticuerpo tiene una buena estabilidad *in vivo* y una semivida *in vivo* larga, y muestra una gran actividad antitumoral *in vivo*.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1a–f muestran la afinidad de unión de anticuerpos HCAb por células (a–b) NUGC4_D8, (c) SNU601, (d) HEK293/hCLDN18.2 y (e–f) HEK293/hCLDN18.1.

10 Las FIG. 2a–b muestran la actividad de unión competitiva de anticuerpos HCAb frente a (a) PR000400 y (b) PR004549 para células HEK293/hCLDN18.2.

Las FIG. 3a–b muestran la viabilidad de células diana cuando se cocultivan con anticuerpos de prueba y un anticuerpo anti-IgG humana acoplado con MMAF.

15 Las FIG. 4a–h muestran las estructuras de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3.

Las FIG. 5a–s muestran la afinidad de unión de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 por células (a–c) HEK293/hCLDN18.2, (d–i) NUGC4_D8, (j–o) Jurkat y (p–s) HEK293/hCLDN18.1.

20 Las FIG. 6a–w muestran (a) el rendimiento de la expresión de CLDN18.2 por parte de células IM95, y la actividad TDCC de anticuerpos biespecíficos frente a células (b–k) NUGC4_D8, (l–o) IM95, (p–s) HEK293/hCLDN18.1 y (t–w) SNU620.

La FIG. 7 muestra la afinidad de unión de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 por células que sobreexpresan las proteínas CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 de la familia de parálogos de la CLDN18.2 humana.

25 Las FIG. 8a–c muestran la afinidad de unión de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 por células (a) HEK293/cynoCLDN18.1, (b) HEK293/cynoCLDN18.2 y (c) linfocitos T CD3+ de macaco.

La FIG. 9 muestra la actividad TDCC de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 frente a células HEK293/cynoCLDN18.2 por parte de linfocitos T de macaco.

30 Las FIG. 10a–b muestran la liberación de citocinas inducida por anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 *in vitro*. (a) TNF α y (b) IL-6.

Las FIG. 11a–b muestran la actividad ADCC de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 frente a células (a) Jurkat y (b) NUGC4_D8.

35 Las FIG. 12a–b muestran la actividad CDC de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 frente a células (a) HEK293/hCLDN18.2 y (b) Jurkat.

Las FIG. 13a–b muestran la actividad de unión competitiva de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 frente a (a) PR000400 y (b) PR004549 para células HEK293/hCLDN18.2.

La FIG. 14 muestra la farmacocinética de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3.

Las FIG. 15a–e muestran estudios de la farmacodinámica *in vivo* en modelos de tumor (a-b) NUGC4_D8 PBMC, (c) SNU620 PBMC y (d) HuP-T4 PBMC, y (e) el estudio de la hipercitocinemia *in vivo* en anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, que no se pretende que limiten la presente invención. Los procedimientos experimentales sin condiciones especificadas en los siguientes ejemplos se realizan de acuerdo con procedimientos y condiciones convencionales, o de acuerdo con las instrucciones.

Ejemplo 1: Preparación del vector de expresión y líneas celulares transfectadas de forma estable e inmunización de ratones

1.1. Preparación del vector de expresión para inmunizar ratones

Se preparó un vector de expresión de CLDN18.2 humana para inmunizar ratones transgénicos completamente humanizados del siguiente modo: se sintetizó una secuencia de ADNc que codificaba CLDN18.2 humana (ID de Uniprot P56856-iso2) y la secuencia codificante del gen de la CLDN18.2 humana se clonó en un plásmido pCAGGS (YOUBIO, VT1076) mediante digestión enzimática.

1.2. Preparación de líneas celulares transformadas de forma estable

Se construyeron específicamente líneas celulares HEK293 (ATCC, N.º de Cat.: CRL-1573) que expresaban de forma estable CLDN18.1 o CLDN18.2 humana del siguiente modo: se transfectaron plásmidos que codificaban CLDN18.1 (GenScript, OHu29174D) o CLDN18.2 humana (GenScript, OHu03374D) en células HEK293 para producir líneas celulares estables que sobreexpresaban CLDN18.1 o CLDN18.2 humana. La expresión de CLDN18.1 y CLDN18.2 se detectó mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés). Específicamente, se sembraron 20 000 células transfectadas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, tras lo cual se añadió un anticuerpo anti-CLDN18 humana producido en conejo comercializado (LifeSpan Bio, LS-C168812-400). Después de 1 h de incubación a 4 °C, las células se lavaron 2 veces con PBS y a continuación se añadió un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con AF-680 (Invitrogen, A21109). Después de 1 h de incubación a 4 °C, las células se lavaron 3 veces con PBS y a continuación se monitoreó la intensidad de fluorescencia de las células utilizando un instrumento FACS (IntelliCytique Plus BR).

1.3. Inmunización de ratones

Se inmunizaron ratones transgénicos completamente humanizados (ratones HCAb 1.0 Harbour comercializados, adquiridos en Harbour BioMed) con el vector de expresión de CLDN18.2 humana y células HEK293 que expresaban CLDN18.2 (células HEK293/hCLDN18.2) preparadas anteriormente. Se prepararon balas para un cañón de genes con el vector de expresión de CLDN18.2 humana y oro en polvo. Los ratones se inmunizaron en múltiples sitios de su abdomen utilizando el cañón de genes. Los ratones se inmunizaron con el ADN del vector de expresión (50 µg cada vez) en intervalos de 2 semanas. Después de tres inmunizaciones, los ratones se inmunizaron entonces con células HEK293/hCLDN18.2 en intervalos de 2 semanas, con 4×10^6 células por ratón para cada inmunización. Después de dos inmunizaciones, se extrajo sangre para la medición de los títulos. El suero de los ratones se analizó para determinar la afinidad de unión mediante FACS utilizando células CHOK1 que expresaban CLDN18.2 humana (kyinno, KC-1180). Se seleccionaron los ratones según los resultados de la medición de los títulos para el cribado de los anticuerpos monoclonales HCAb. Los ratones se sometieron a inmunización potenciada 3 días antes del cribado, con células HEK293/hCLDN18.2, 4×10^6 células por ratón, como inmunógeno-.

Ejemplo 2: Producción y cribado de los anticuerpos monodominio HCAb anti-CLDN18.2

Se seleccionaron los ratones con un título alto de anticuerpo anti-CLDN18.2 en suero obtenidos en el Ejemplo 1. Se extirparon los bazo de estos ratones y se aislaron los linfocitos B. Se separaron las células plasmáticas positivas para CD138 (BD, 558626) utilizando un clasificador de células BD FACS AriaIII, y se enriquecieron las poblaciones de linfocitos B positivos para CLDN18.2 (CHOK1/hCLDN18.2, kyinno, KC-1180) utilizando perlas magnéticas (ThermoFisher, 11206D). Se extrajo el ARN de los linfocitos B y se sometió a transcripción inversa para obtener ADNc (sistema de síntesis SuperScript IV First-Strand, Invitrogen, 18091200), y se amplificaron genes de VH humano mediante PCR utilizando cebadores específicos. Cebadores de PCR:

5'-GGTGTCCAGTGTSAAGGTGCAGCTG-3' (SEQ ID NO: 249)

5'-AATCCCTGGGCACTGAAGAGACGGTGACC-3' (SEQ ID NO: 250)

Los fragmentos de genes de VH amplificados se construyeron en forma de vectores pCAG plasmídicos de expresión de células de mamífero que codificaban la secuencia del dominio Fc de cadena pesada del anticuerpo IgG1 humana.

Los plásmidos construidos se transfectaron en células hospedadoras de mamífero HEK293 (ATCC, CRL-1573) para obtener un sobrenadante de expresión del anticuerpo HCAb. Se realizó un cribado primario mediante Mirrorball utilizando CHOK1/hCLDN18.2 que expresaban CLDN18.2 humana. Se seleccionaron los clones positivos para un cribado secundario. El cribado secundario se realizó mediante FACS utilizando células HEK293/hCLDN18.1 y HEK293/hCLDN18.2.

Aunque se obtuvieron 295 anticuerpos monoclonales que se unían específicamente a CLDN18.2 humana, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos que codificaban los dominios variables de las moléculas de anticuerpo y las secuencias de aminoácidos correspondientes utilizando medios de secuenciación convencionales. Después de eliminar las secuencias repetidas, se obtuvieron 211 anticuerpos monoclonales HCAb contra CLDN18.2 completamente humanos que tenían secuencias únicas y se unían específicamente a CLDN18.2 humana. Se seleccionaron 54 anticuerpos con las calificaciones globales más altas para la expresión recombinante según el resultado del cribado primario y el resultado del cribado secundario. Los anticuerpos monoclonales purificados se cribaron además por la capacidad de unirse a células tumorales que expresaban de forma endógena CLDN18.2 humana mediante citometría de flujo y se seleccionaron las 8 mejores secuencias de anticuerpo en las calificaciones globales como moléculas candidatas, tal como se muestra en la Tabla 3.

Los expertos en la técnica saben de sobra que las CDR de un anticuerpo se pueden definir en la técnica utilizando diversidad de métodos, tales como el esquema de Kabat basado en la variabilidad de las secuencias (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Institutos Nacionales de Salud (Estados Unidos), Bethesda, Maryland (1991)) y el esquema de Chothia basado en la ubicación de las regiones de bucle estructural (véase *J Mol Biol* 273: 927–48, 1997). En la presente solicitud, también se puede utilizar el esquema combinado que comprende el esquema de Kabat y el esquema de Chothia para determinar los residuos aminoacídicos en una secuencia de dominio variable. El esquema combinado combina el esquema de Kabat con el esquema de Chothia para obtener un intervalo más grande, que se detalla en la Tabla 2 del compendio de la presente invención. El análisis de los genes de la línea germinal y el análisis del sitio PTM (siglas en inglés del sitio de modificación postraduccional) que se obtienen después de la secuenciación de este ejemplo se muestran a continuación en la Tabla 2. Los números de las secuencias de las proteínas de unión al antígeno se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 2. Análisis de los genes de la línea germinal y análisis del sitio de modificación postraduccional (PTM) de las secuencias de anticuerpos HCAb

N.º	Clon N.º	Anticuerpo	Gen V de la línea germinal VH	PTM de VH
1	R1029P(CG20)001B02	PR004227	IGHV3-74*01	DG (HCDR2)
2	R1029P021E10	PR004533	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
3	R1029P028A11	PR004536	IGHV3-74*01	NS (HCDR2), DG

				(HCDR2)
4	R1029P037B07	PR004540	IGHV3-74*01	DG (HCDR2), NxS/T (HCDR2)
5	R1029P021C02	PR004949	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
6	R1029P021F07	PR004950	IGHV3-74*01	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
7	R1029P021H07	PR004952	IGHV3-74*03	NS (HCDR2), DG (HCDR2)
8	R1029P024B07	PR004953	IGHV3-30*03	DG (HCDR2)

Tabla 3. Números de las secuencias de HCAb anti-CLDN18.2

	SEQ ID NO:				
Anticuerpo	Cadena pesada	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
PR004227	182	150	16	42	77
PR004533	183	151	16	43	78
PR004536	184	152	16	44	79
PR004540	185	153	17	45	80
PR004949	186	154	18	43	80
PR004950	187	155	18	43	78
PR004952	188	156	16	43	81
PR004953	189	157	16	46	82

Ejemplo 3: Eliminación del sitio de modificación postraduccional de los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2

PR004533 y PR004536 tienen ambos un sitio de isomerización y un sitio de desamidación en la región CDR2 de la cadena pesada. Para el sitio de modificación postraduccional en la región CDR2, se mutaron al azar cuatro aminoácidos de NS y DG mediante PCR. Los productos de PCR se transfectaron eléctricamente en *E. coli* para crear una colección de mutación al azar de cuatro sitios de aminoácidos. La colección de mutantes se cribó mediante Mirrorball utilizando células CHOK1/hCLDN18.1 y CHOK1/hCLDN18.2, y se seleccionaron las moléculas positivas que se unían específicamente a CLDN18.2 para su secuenciación. Los números de las secuencias de las moléculas se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Parte de los números de las secuencias de las moléculas mutadas PR004533 y PR004536

	Anticuerpo	Cadena pesada	VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3	Clon mutado
5	PR007242	191	159	16	48	78	4533_M10E1
	PR007243	192	160	16	49	78	4533_M3D9
	PR007244	193	161	16	50	78	4533_M4H6
	PR007245	194	162	16	51	78	4533_M6E6
	PR007246	195	163	16	52	78	4533_M3F10
10	PR007247	196	164	16	53	79	4536_M8A6
	PR007248	197	165	16	54	78	4533_M10E7

Ejemplo 4: Preparación y caracterización de los anticuerpos monodominio HCAb anti-CLDN18.2 completos

4.1. Preparación de los anticuerpos monodominio HCAb recombinantes

15 Después de obtener la secuencia del dominio variable de cadena pesada que codifica las moléculas de anticuerpo monodominio HCAb, la secuencia del dominio variable de cadena pesada puede fusionarse con la secuencia correspondiente del dominio constante de cadena pesada del anticuerpo humano y expresarse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales para obtener moléculas de anticuerpo monodominio HCAb recombinante. En
20 este ejemplo, la secuencia del dominio variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo se sintetizó genéticamente y se clonó en un vector plasmídico de expresión de células de mamífero que codificaba la secuencia del dominio constante de cadena pesada del anticuerpo IgG1 humana para codificar una secuencia completa que producía el anticuerpo monodominio HCAb. En este ejemplo, las secuencias de los dominios variables de las moléculas de
25 anticuerpo monoclonal obtenidas a partir de ratones HCAb Harbour inmunizados eran secuencias de anticuerpo humano, por lo tanto, también se obtuvo un anticuerpo HCAb recombinante anti-CLDN18.2 completamente humano a partir de este ejemplo.

Los plásmidos que codificaban anticuerpos monodominio HCAb recombinantes se transfectaron en células hospedadoras de mamífero (p. ej., células de ovario de hámster chino
30 (CHO, por sus siglas en inglés)), y se puede obtener el anticuerpo recombinante purificado correspondiente utilizando técnicas de expresión y purificación de proteínas recombinantes convencionales. Específicamente, se expandieron células ExpiCHO-S™ (Gibco, A29127) en medio de expresión ExpiCHO™ (Gibco, A2910001). Antes de la transfección transitoria, las células se ajustaron a una concentración de 3×10^6 a 4×10^6 células/mL y se cultivaron en un
35 agitador con un 8% de CO₂ a 37 °C durante 24 h, lo cual condujo a una concentración celular de 7×10^6 a 10×10^6 células/mL. Las células se diluyeron a continuación hasta 6×10^6

células/mL y se prepararon 10 mL de las células cultivadas. 8 µg de los plásmidos anteriores que codificaban anticuerpos monodominio HCAb (la relación de los plásmidos respecto a las células es de 0.8 µg : 1 mL) se disolvieron en 0.4 mL de medio SFM OptiPRO™ (Gibco, 12309019). La mezcla resultante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para su esterilización.

5 A continuación, se añadieron 32 µL de reactivo CHO ExpiFectamine™ (Gibco, A29129) a 0.37 mL de medio SFM OptiPRO™ (Gibco, 12309019). La solución de reactivo CHO ExpiFectamine™ se añadió de inmediato lentamente a la solución del plásmido. La mezcla se invirtió para mezclarla bien. La solución mezclada de plásmido y reactivo de transfección se añadió lentamente gota a gota mientras se agitaba el matraz. Las células se cultivaron en un
10 agitador con un 8% de CO₂ a 37 °C durante 8–9 días. La viabilidad celular se comprobó después de 8 días.

El cultivo se recogió y se centrifugó a 3300 g durante 10 min, y a continuación se recogió el sobrenadante y se centrifugó a velocidad alta para eliminar las impurezas. Se equilibró una columna de gravedad (Bio-Rad, #7311550) que contenía MabSelect™ (GE
15 Healthcare Life Science, 71-5020-91 AE) con PBS (pH 7.4) y se lavó con 2–5 volúmenes de columna de PBS. La muestra del sobrenadante se cargó sobre una columna. La columna se lavó con 5–10 volúmenes de columna de PBS. La proteína diana se eluyó con glicina 0.1 M (pH 3.5). El eluido se ajustó a neutralidad con Tris-HCl (pH 8.0) y se concentró, y se realizó un intercambio del tampón a tampón PBS con un tubo de ultrafiltración (Millipore, UFC901024)
20 para obtener una solución de anticuerpo purificado. A continuación, la solución de anticuerpo purificado se sometió a una determinación de la concentración utilizando NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One), se subenvasó y se almacenó para su uso posterior.

4.2. Caracterización de los anticuerpos mediante SEC-HPLC, HIC-HPLC y DSF

Una cantidad apropiada de la muestra purificada anterior se cargó sobre una columna
25 de SEC analítica TSKgel G3000SWxl (modelo del sistema HPLC: 1260 Infinity II de Agilent) para medir la pureza. En este método, se utilizaron los siguientes parámetros y condiciones: fase móvil: 1×PBS, pH 7.4 (Sangon, E607016); temperatura ambiente; flujo: 1.0 mL/min; concentración de la muestra: 1 mg/mL; volumen de inyección: 20 µL; longitud de onda de detección: 280 nm. Después del registro, el cromatograma se integró utilizando el programa
30 informático ChemStation y se calcularon los datos relevantes. Se generó un análisis, con los tiempos de retención reportados para los diferentes componentes de la muestra.

Una cantidad apropiada de la muestra purificada anterior se cargó sobre una columna de HIC analítica TSKge1 Butyl-NPR 4.6*35 (modelo del sistema HPLC: 1260 Infinity II de Agilent) para medir la pureza y la hidrofobia. El método consistía en un gradiente lineal de un
35 100% de la fase móvil A (PB 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 1.8 M, pH 6.0) a un 100% de la fase móvil B (PB 20 mM, pH 6.0) en 16 min. El flujo se fijó en 0.7 mL/min, la concentración de la muestra era de 1 mg/mL, el volumen de inyección era de 20 µL y la longitud de onda de detección era de

280 nm. Después del registro, el cromatograma se integró utilizando el programa informático ChemStation y se calcularon los datos relevantes. Se generó un análisis, con los tiempos de retención reportados para los diferentes componentes de la muestra.

En este ejemplo, se midió la temperatura de desnaturalización térmica (T_m) de una molécula proteínica mediante fluorimetría diferencial de barrido (FDB). Se añadieron 10 μg de proteína a una placa de PCR de 96 pocillos (Thermo, AB-0700/W), tras lo cual se añadieron 2 μL de tinte SYPRO™ (Invitrogen, 2008138) diluido 100 $\times$ y a continuación se añadió tampón para obtener un volumen final de 40 μL por pocillo. La placa de PCR se selló, se introdujo en un instrumento de PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real (sistema CFX96 PCR de Bio-Rad), se incubó a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, a continuación se calentó gradualmente desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 95 $^{\circ}\text{C}$ en un gradiente de 0.2 $^{\circ}\text{C}/0.2$ min y se enfrió hasta 25 $^{\circ}\text{C}$ al final de la prueba. Se utilizó el modo de barrido FRET y se realizó un análisis de datos utilizando el programa informático CFX Maestro de Bio-Rad para calcular la T_m de la muestra. Los resultados de la caracterización anterior se muestran a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Caracterización de los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2

Anticuerpo	Pureza según SEC-HPLC (%)	Pureza según HIC-HPLC (%)	Tiempo de retención según HIC-HPLC (min)	T_m1 ($^{\circ}\text{C}$)	T_m2 ($^{\circ}\text{C}$)
PR004227	87.8	86.5	19.2	52.2	64.4
PR004533	99.2	100.0	17.2	ND	64.2
PR004536	97.6	100.0	17.1	52.8	66.0
PR004540	99.4	100.0	17.5	52.8	65.4
PR004949	99.2	100.0	16.0	59.0	ND
PR004950	98.7	100.0	16.2	ND	65.4
PR004952	100.0	100.0	15.8	61.2	ND
PR004953	98.2	100.0	18.9	60.0	ND
PR007242	94.3	100.0	15.7	56.6	65.4
PR007243	99.1	92.5	15.3	55.6	64.8
PR007244	99.1	94.3	15.3	59.6	ND
PR007245	98.9	94.5	15.2	59.8	ND
PR007246	99.1	93.9	15.2	59.0	64.6
PR007247	98.1	94.3	16.3	52.0	65.2
PR007248	99.3	100.0	15.4	60.6	ND
Trastuzumab	100.0	100.0	16.0	67.8	79.2

Ejemplo 5: Afinidad de unión de los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2 a células

La afinidad de unión de un anticuerpo se detectó mediante FACS utilizando células HEK293 que expresaban CLDN18.1 humana, células HEK293 que expresaban CLDN18.2 humana, células NUGC4_D8 y células SNU601 que expresaban de forma endógena CLDN18.2 humana (Cobioer, CBP60507). Se cribaron células NUGC4_D8 subclonadas limitando la dilución utilizando células NUGC4 (JCRB, JCRB0834). La afinidad de unión se determinó del siguiente modo: se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min y a continuación se resuspendieron en tampón de FACS (PBS que contenía un 2% de FBS). La densidad celular se ajustó a 10^6 células/mL y se añadieron 50 μ L de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se diluyeron en concentraciones diferentes con tampón de FACS y se añadieron 50 μ L de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Después de 2 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. A continuación, se añadió tampón de FACS que contenía un anticuerpo secundario anti-IgG humana producido en cabra conjugado con APC (Jackson, 109-605-098). Después de 1 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. Las células se resuspendieron en solución fijadora y a continuación se monitoreó la fluorescencia de las células utilizando un instrumento FACS (ACEA NovoCyte). Se utilizó PR000400, un análogo de IMAB362 (de fabricación propia, véase el documento WO 2014/146672, con la misma región variable que IMAB362, que difiere de IMAB362 en solamente unos pocos aminoácidos en la región constante), como control positivo para la unión a CLDN18.2. Se utilizó PR004549, un análogo de CL-1xI2C scFc (de fabricación propia, véase el documento WO2020025792A1, con la misma región variable que CL-1xI2C scFc, que difiere de CL-1xI2C scFc en solamente unos pocos aminoácidos en la región constante), como control positivo para la unión a CLDN18.2. Se utilizó el anticuerpo PR002725 como control positivo para la unión a CLDN18.1. Véase el documento CN2020/118650 (Tabla 6, Tabla 7 y Tabla 8). Se utilizó el anticuerpo Iso hlgG1 (CrownBio, C0001-4) como control negativo.

Las FIG. 1 (a–b), la Tabla 9 y la Tabla 10 muestran la afinidad de unión de anticuerpos por células NUGC4_D8 que expresan de forma endógena CLDN18.2. Los anticuerpos de prueba fueron capaces de unirse a células NUGC4_D8 de un modo dependiente de la dosis. Los resultados muestran que: los anticuerpos PR004533, PR004949, PR004950, PR004952, PR004953, PR007242, PR007243, PR007244, PR007245, PR007246 y PR007248 presentan una afinidad más alta por las células NUGC4_D8 que expresan de forma endógena CLDN18.2 que PR000400. La FIG. 1c y la Tabla 11 muestran la afinidad de unión de los anticuerpos por células SNU601 que expresan de forma endógena CLDN18.2. Los anticuerpos de prueba fueron capaces de unirse a células SNU601 de un modo dependiente de la dosis. Los resultados muestran que: los anticuerpos PR004227, PR004533, PR004536, PR004540, PR004949, PR004950 y PR004952 presentan una afinidad más alta por las células SNU601

que expresan de forma endógena CLDN18.2 que PR000400. La FIG. 1d y la Tabla 12 muestran la afinidad de unión de los anticuerpos por células HEK293 que sobreexpresan CLDN18.2 humana (HEK293/hCLDN18.2). Las FIG. 1 (e–f) muestran la afinidad de unión de los anticuerpos a células HEK293 que sobreexpresan CLDN18.1 humana (HEK293/hCLDN18.1). Los anticuerpos de prueba tienen una afinidad de unión baja por las células HEK293/hCLDN18.1. De los resultados anteriores, se puede inferir que los anticuerpos de prueba se unen a la proteína CLDN18.2 humana en ECL1 (bucle extracelular 1) en lugar de ECL2.

Tabla 6. Descripción de las moléculas de anticuerpo de referencia

10	Anticuerpo	Diana	Descripción
	PR000400	CLDN18.2	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CLDN18.2 con una secuencia de la patente WO2014/146672.
	PR001861	CLDN18.1	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CLDN18.1, de fabricación propia en Harbour BioMed.
15	PR002725	CLDN18.1	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CLDN18.1 con una secuencia de la patente PCT/CN2020/118650.
	PR002726	CLDN18.2	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CLDN18.2 con una secuencia de la patente PCT/CN2020/118650.
20	PR000325	Lisozima de gallina	Un anticuerpo monoclonal IgG1 dirigido contra lisozima de gallina, utilizado como control isotípico.
	PR001848	CD3	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CD3 con una secuencia de la patente PCT/CN2020/118606.
	PR003886	CD3	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CD3 con una secuencia de la patente PCT/CN2020/118606.
25	PR005080	CLDN2	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CLDN2 con una secuencia de la patente EP3567053A1.
	PR003767	TRBC1	Un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-TRBC1, utilizado como control para los experimentos de ADCC.
30	PR004549	CLDN18.2/CD3	Un anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2xCD3 con una secuencia de la patente WO2020025792A1.
	PR004931	CEA/CD3	Un anticuerpo biespecífico contra CEAxCD3 con una secuencia de la patente WO2017055389A1.
35	PR002199	BCMA/CD3	Un anticuerpo biespecífico contra BCMACD3 con una secuencia de la patente WO2018052503.

5	PR004312	Lisozima de gallina/CD3	Un anticuerpo biespecífico dirigido contra lisozima y CD3, construido utilizando las secuencias de PR000325 y PR001848.
	PR004313	CLDN18.1/CD3	Un anticuerpo biespecífico dirigido contra CLDN18.1 y CD3, construido utilizando las secuencias de PR001861 y PR001848.

Tabla 7. Números de las secuencias de los anticuerpos de referencia (anticuerpos monoclonales)

10	Anticuerpo	Cadena ligera	Cadena pesada	VL	VH	LCD R1	LCD R2	LCD R3	HC DR1	HC DR2	HC DR3
	PR000400	199	175	167	143	100	115	130	10	37	71
15	PR001861	201	177	169	145	102	117	132	12	39	73
	PR002725	202	178	170	146	103	117	132	13	39	74
20	PR002726	203	179	171	147	104	118	133	14	40	75
	PR000325	198	174	166	142	99	114	129	9	36	70
25	PR001848	200	176	168	144	101	116	131	11	38	72
	PR003886	200	181	168	149	101	116	131	11	38	72
30	PR005080	205	190	173	158	106	120	135	19	47	83
	PR003767	204	180	172	148	105	119	134	15	41	76

Tabla 8. Números de las secuencias de los anticuerpos de referencia (anticuerpos biespecíficos)

25	SEQ ID NO:			
	Anticuerpo	Cadena polipeptídica-1	Cadena polipeptídica-2	Cadena polipeptídica-3
30	PR004549	212		
	PR004931	218	215	217
35	PR002199	206	207	208
	PR004312	210	209	200
40	PR004313	211	209	200

Tabla 9. La afinidad de unión de los anticuerpos anti-CLDN18.2 (con sitios de modificación postraduccional en CDR) por células NUGC4_D8 (véase la FIG. 1a)

35	Anticuerpo	Título CE₅₀ (nM)	Eficacia E_{máx} (IFM)
	PR000400	17.0	100,612
40	PR004227	ND	ND
	PR004533	25.0	183,235

PR004536	ND	ND
PR004540	ND	ND
PR004949	21.8	265,481
PR004950	16.1	206,071
PR004952	41.0	239,521
PR004953	12.0	218,991
PR004549	ND	ND

Tabla 10. La afinidad de unión de los anticuerpos mutados PR004533 y PR004536 por células NUGC4_D8 (véase la FIG. 1b)

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (nM)	Eficacia E _{máx} (IFM)
PR000400	56.4	58,383
PR007242	69.5	176,098
PR007243	78.2	176,068
PR007244	49.2	152,567
PR007245	63.2	136,796
PR007246	55.9	165,611
PR007247	ND	ND
PR007248	74.6	174,113

Tabla 11. La afinidad de unión de los anticuerpos anti-CLDN18.2 por células SNU601

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (nM)	Eficacia E _{máx} (IFM)
PR000400	ND	ND
PR004227	28.5	14,849
PR004533	11.9	11,308
PR004536	52.7	15,799
PR004540	ND	ND
PR004949	12.8	18,260
PR004950	14.6	13,574
PR004952	16.4	12,179
PR004953	ND	ND
PR004549	ND	ND

Tabla 12. La afinidad de unión de los anticuerpos anti-CLDN18.2 por células HEK293/hCLDN18.2

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (nM)	Eficacia E _{máx} (IFM)
PR000400	5.60	1,319,493
PR007242	11.3	1,478,230

PR007243	13.3	1,467,203
PR007244	11.7	1,301,214
PR007245	13.0	1,307,122
PR007246	14.4	1,374,904
PR007247	35.3	1,272,613
PR007248	12.8	1,313,402

Ejemplo 6: Actividad de unión competitiva de los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2

Este ejemplo es para estudiar la unión de anticuerpos monoclonales HCAb anti-CLDN18.2 humana a la región epitópica del antígeno CLDN18.2 humana. Se realizaron experimentos de unión competitiva al nivel celular utilizando células HEK293/hCLDN18.2 que sobreexpresaban CLDN18.2 humana. Resumiendo, se biotinilaron los anticuerpos anti-CLDN18.2 humana PR000400 y PR004549 utilizando un kit de biotinilación (ThermoFisher, A35358) de acuerdo con las instrucciones. Se mezclaron bien 50 μ L de cada uno de los anticuerpos anti-CLDN18.2 humana PR000400 o PR004549 biotinilados con 50 μ L de un anticuerpo anti-CLDN18.2 humana sin biotinilar diluido en serie correspondiente en una placa con fondo en V de 96 pocillos (Corning, 3894). A continuación, la suspensión de células HEK293/hCLDN18.2 que sobreexpresaban CLDN18.2 humana se ajustó a 3×10^6 células/mL, sembradas a razón de 50 μ L/pocillo. Las células se coincubaron a 4 °C durante 2 h. Las células de cada pocillo se lavaron dos veces con 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente (2% de FBS en PBS) y se centrifugaron a 500 g a 4 °C durante 5 min, y después se descartó el sobrenadante. Después de lavar dos veces, se añadió un anticuerpo secundario fluorescente (BD, 554060, concentración final de 1 μ g/mL) y se incubó en la oscuridad a 4 °C durante 1 h. Las células de cada pocillo se lavaron dos veces con 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente (2% de FBS en PBS) y se centrifugaron a 500 g a 4 °C durante 5 min, y después se descartó el sobrenadante. Por último, las células de cada pocillo se resuspendieron en 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente, y los valores de la señal de fluorescencia se leyeron utilizando un BD FACS CANTOII. La tasa de inhibición se calculó utilizando la fórmula, tasa de inhibición (%) = $(A - B)/A \times 100$ (nota: A: señal de fluorescencia después de la interacción del anticuerpo biotinilado con ISO hlgG1 (Crownbio, C0001-4); B: señal de fluorescencia después de la interacción del anticuerpo biotinilado con el anticuerpo sin biotinilar).

Como se muestra en las FIG. 2(A–b) y la Tabla 13, los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2 de la presente invención son todos ellos capaces de bloquear la unión de PR000400 o PR004549 a CLDN18.2 humana, y la capacidad de bloqueo detectada de los anticuerpos aumenta con la concentración de anticuerpo de un modo correlacionado positivamente; la tasa de inhibición puede alcanzar >80%, lo cual indica que el HCAb de

prueba tiene epítomos muy similares a los de PR000400 y PR004549. Los anticuerpos de prueba tienen una afinidad de unión baja por las células HEK293/hCLDN18.1. De los resultados anteriores, se puede inferir que los anticuerpos de prueba se unen a la proteína CLDN18.2 humana en ECL1 (bucle extracelular 1) en lugar de ECL2.

5 Tabla 13. La capacidad de unión competitiva de los anticuerpos anti-CLDN18.2 frente a PR000400 y PR004549

	Anticuerpo	PR000400 biotinilado 10 nM		PR004549 biotinilado 200 nM	
		Cl ₅₀ (nM)	Tasa de inhibición máxima (%)	Cl ₅₀ (nM)	Tasa de inhibición máxima (%)
10	PR004533	25.5	98.6	23.2	93.7
	PR004536	103	98.0	74.1	90.1
	PR004540	64.1	95.8	50.0	89.2
	PR004227	22.3	98.3	20.3	93.8
15	PR004949	35.4	98.5	31.0	94.2
	PR004950	23.5	98.5	19.9	94.3
	PR004952	30.1	98.5	27.8	93.3
	PR004953	16.7	98.0	13.8	93.2
	PR000400	20.1	96.4	11.5	90.7
20	PR004549	946	76.5	379	58.4
	Iso hIgG1	ND	0.00	ND	0.00

Ejemplo 7: Actividad endocítica de los anticuerpos HCAb anti-CLDN18.2

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos de inducir la destrucción citotóxica frente a células NUGC4_D8 al cocultivarlas con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con MMAF (Moradec, N.º de Cat: AH-102-AF) utilizando un kit de ensayo de la viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, G7573). Se centrifugaron células NUGC4_D8 a 300 g durante 5 min y después se resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 + 10% de FBS) para ajustar la densidad de las células a 2×10^4 células/mL. Se añadieron 50 µL de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron a 37 °C durante la noche. Los anticuerpos se diluyeron en concentraciones diferentes con medio y se añadieron 25 µL de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. El anticuerpo anti-IgG humana conjugado con MMAF se diluyó con medio y se añadieron 25 µL de la dilución de anticuerpo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos hasta una concentración final de 6.6 nM. Las células se incubaron con el anticuerpo a 37 °C durante 3 días. La placa de 96 pocillos se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 100 µL de solución cromogénica CellTiter-Glo a cada pocillo a temperatura ambiente. A continuación, la

muestra se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min. La placa se leyó con PE Enspire. Viabilidad celular (%) = [(muestra luminiscente)/(control simulado luminiscente)] × 100. Se utilizó PR000400 (análogo de IMAB362) como control positivo y el anticuerpo Iso hlgG1 (CrownBio, C0001-4) como control negativo. Las FIG. 3(a–b) muestran la

5 viabilidad de las células diana. Al cocultivar con el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con MMAF, los anticuerpos de prueba presentan un mejor efecto citotóxico frente a células NUGC4_D8 de un modo dependiente de la dosis, en comparación con PR000400.

Ejemplo 8: Estructura y diseño de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Se utilizaron anticuerpos anti-CLDN8.2 y anti-CD3 seleccionados para preparar un

10 anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 preparado puede unirse a dos dianas de forma simultánea, con un extremo capaz de reconocer CLDN18.2 expresada específicamente en las superficies de células tumorales y otro extremo capaz de unirse a moléculas de CD3 en linfocitos T. Después de unirse a la superficie de las células tumorales, la molécula de anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 puede reclutar y

15 activar linfocitos T en torno a las células tumorales, destruyendo de este modo las células tumorales.

Como se muestra en la FIG. 4, la estructura (1) es una molécula con la estructura asimétrica “2+1” Fab-Fc-VH dual; para la molécula con la estructura asimétrica “2+1”, la estructura implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del

20 anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica VH dual del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente; las estructuras (2) y (3) eran moléculas con la estructura asimétrica “2+1” HCAb-Fc-Fab, que implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica HCAb del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente.

25 La estructura (4) es una molécula con la estructura asimétrica “4+1” VH-VH_HC-Fab, que implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica VH tetravalente del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente.

La estructura (5) es una molécula con la estructura asimétrica “4+1” VH-VH_LC-Fab,

30 que implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica VH tetravalente del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente.

La estructura (6) es una molécula con la estructura asimétrica “3+1” VH_HC-Fab-Fc-VH dual, que implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera de un

35 anticuerpo anti-CD3 con el extremo N correspondiente unido a un VH monovalente del anticuerpo anti-CLDN18.2 y la cadena polipeptídica VH bivalente del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente.

La estructura (7) es una molécula con la estructura asimétrica “3+1” Fab-Fc-VH-VH-VH, que implica tres cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica VH trivalente del anticuerpo anti-CLDN18.2, respectivamente.

- 5 La estructura (8) es una molécula con la estructura asimétrica “1+1” Fab-Fc-scFv, que implica dos cadenas proteínicas que comprenden las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente y la cadena polipeptídica scFv del anticuerpo anti-lisozima o anti-CLDN18.1, respectivamente.

Para minimizar la formación de subproductos con cadenas pesadas discrepantes (p. ej., discrepancia de dos cadenas pesadas del anticuerpo anti-CD3), se utilizó una región Fc heterodimérica mutada. Porta una mutación “knob-hole” (botón-ojal) y un enlace disulfuro modificado, como se describen en los documentos WO2009080251 y WO2009080252. El anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 tiene un Fc de IgG1 y porta las mutaciones L234A, L235A o L234A, L235A y G237A (numeradas de acuerdo con el índice EU) en CH3 del Fc. Cada anticuerpo biespecífico se generó mediante la cotransfección simultánea de tres o cuatro vectores de expresión de mamífero diferentes que codificaban: 1) la cadena pesada del anticuerpo anti-CLDN18.2 correspondiente, que porta una mutación “Hole” (ojal) en la región Fc para producir un anticuerpo heterodimérico, CH3 del Fc que porta las mutaciones L234A, L235A o L234A, L235A y G237A; 2) la cadena pesada del anticuerpo anti-CD3 correspondiente, que porta una mutación “knob” (botón) en la región Fc para producir un anticuerpo heterodimérico, CH3 del Fc que porta mutaciones L234A, L235A o L234A, L235A y G237A; y 3) la cadena ligera del anticuerpo anti-CD3 correspondiente. La mutación “knob” en la región Fc de IgG1 humana consiste en: T366W y la mutación “Hole” consiste en: T366S, L368A e Y407V. Además, se pueden incluir S354C en la región Fc de “knob” e Y349C en “Hole”; forman un par de enlaces disulfuro para aumentar la estabilidad y el rendimiento del anticuerpo heterodimérico.

En las Tablas 14, 15 y 16 se muestra información específica sobre los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 contruidos en la presente invención.

Tabla 14. Los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 contruidos de acuerdo con las estructuras (1)–(8) de este ejemplo

Estructura	Molécula de anticuerpo biespecífico	Anticuerpo contra CD3	Anticuerpo contra CLDN18.2	Estructura del extremo o CD3	Estructura del extremo o CLDN18.2	Péptido conector	Tipo de Fc del extremo CD3 (mutación)	Tipo de Fc del extremo CLDN18.2 (mutación)
------------	-------------------------------------	-----------------------	----------------------------	------------------------------	-----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--

								n)	
5	1	PR00460 3	PR00388 6	PR00422 7	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
	1	PR00507 2	PR00388 6	PR00453 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
10	1	PR00507 6	PR00388 6	PR00453 6	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
15	1	PR00535 4	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
	1	PR00539 7	PR00388 6	PR00724 6	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
20	1	PR00539 8	PR00388 6	PR00724 2	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
25	1	PR00539 9	PR00388 6	PR00724 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
	1	PR00540 1	PR00388 6	PR00724 4	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
30	1	PR00541 1	PR00388 6	PR00724 5	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob,	IgG1 humana (hole,

							LALA)	LALA)	
5	1	PR00542 2	PR00388 6	PR00724 7	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
10	1	PR00602 3	PR00184 8	PR00724 6	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
15	1	PR00629 2	PR00388 6	PR00724 5	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
20	1	PR00629 3	PR00184 8	PR00724 5	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
25	1	PR00638 4	PR00388 6	PR00724 6	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
30	1	PR00707 9	PR00388 6	PR00724 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
35	1	PR00708 0	PR00388 6	PR00724 4	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
	1	PR00708 1	PR00388 6	PR00724 2	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
	1	PR00708 2	PR00388 6	PR00724 8	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob,	IgG1 humana (hole,

								AAA)	AAA)
5	1	PR00708 3	PR00388 6	PR00724 5	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, AAA)	IgG1 humana (hole, AAA)
10	2	PR00551 8	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
15	3	PR00551 9	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
20	4	PR00552 0	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
25	5	PR00552 1	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH dual	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
30	6	PR00552 2	PR00184 8	PR00453 3	Fab	VH trivalent e	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
35	7	PR00552 5	PR00388 6	PR00453 3	Fab	VH trivalent e	GS_15	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
	8	PR00431 2	PR00184 8	PR00032 5	Fab	scFv	GS_20	IgG1 humana (knob, LALA)	IgG1 humana (hole, LALA)
	8	PR00431 3	PR00184 8	PR00186 1	Fab	scFv	GS_20	IgG1 humana (knob,	IgG1 humana (hole,

							LALA)	LALA)
--	--	--	--	--	--	--	-------	-------

Tabla 15. Los números de las secuencias del anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 de la presente invención

		SEQ ID NO:		
5	Anticuerpo	Cadena polipeptídica-1	Cadena polipeptídica-2	Cadena polipeptídica-3
	PR004603	214	213	200
	PR005072	219	213	200
	PR005076	220	213	200
10	PR005397	221	213	200
	PR005398	222	213	200
	PR005399	223	213	200
	PR005401	224	213	200
	PR005411	225	213	200
15	PR005422	226	213	200
	PR005518	227	228	200
	PR005519	227	230	229
	PR005520	219	231	200
20	PR005521	219	232	229
	PR005522	219	233	200
	PR005525	234	213	200
	PR005354	219	209	200
	PR006023	221	209	200
25	PR006292	236	235	200
	PR006293	236	237	200
	PR006384	238	235	200
	PR007079	239	235	200
	PR007080	240	235	200
30	PR007081	241	235	200
	PR007082	242	235	200
	PR007083	243	235	200

Tabla 16. Los números de las secuencias de las CDR del dominio de unión al antígeno del anticuerpo biespecífico contra CLDN18.2×CD3 de la presente invención

35			SEQ ID NO:
----	--	--	-------------------

5	Númer o de estruct ura	Núme ro de moléc ula	Númer o de domini o de unión al antíge no	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
10	1	PR004 603	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	42	77
	1	PR005 072	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
15	1	PR005 076	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	44	79
	1	PR005 354	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
20	1	PR005 397, PR006 384	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	52	78
25	1	PR005 398, PR007 081	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	48	78
	1	PR005 399, PR007 079	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	49	78
30	1	PR005 401, PR007 080	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	50	78
35	1	PR005 411, PR006 292,	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	51	78

5		PR007 083							
	1	PR005 422	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	53	79
	1	PR006 023	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	52	78
	1	PR006 293	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	51	78
	1	PR007 082	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	54	78
	2	PR005 518	#1	101	116	131	11	38	72
#2						16	43	78	
15	3	PR005 519	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
	4	PR005 520	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
	5	PR005 521	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
	6	PR005 522	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78
	7	PR005 525	#1	101	116	131	11	38	72
			#2				16	43	78

Ejemplo 9: Preparación y caracterización de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

9.1. Preparación de anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 recombinantes

Una pluralidad de plásmidos que codificaban anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2xCD3 recombinantes se transfectaron en células hospedadoras de mamífero (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO)) de acuerdo con una proporción determinada, y se puede obtener el anticuerpo recombinante purificado correspondiente utilizando técnicas de expresión y purificación de proteínas recombinantes convencionales. Específicamente, se expandieron células ExpiCHO-S™ (Gibco, A29127) en medio de expresión ExpiCHO™ (Gibco, A2910001). Antes de la transfección transitoria, las células se ajustaron a una concentración de 3×10^6 a 4×10^6 células/mL y se cultivaron en un agitador con un 8% de CO₂ a 37 °C durante 24 h, lo cual condujo a una concentración celular de 7×10^6 a 10×10^6 células/mL. Las células se diluyeron a continuación hasta 6×10^6 células/mL y se prepararon 10 mL de las células cultivadas. Un total de 8 µg de los plásmidos anteriores que codificaban anticuerpos

biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 (la relación de los plásmidos respecto a las células es de 0.8 µg : 1 mL) se disolvieron en 0.4 mL de medio SFM OptiPRO™ (Gibco, 12309019). La mezcla resultante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para su esterilización. A continuación, se añadieron 32 µL de reactivo CHO ExpiFectamine™ (Gibco, A29129) a 0.37 mL de medio SFM OptiPRO™ (Gibco, 12309019). La solución de reactivo CHO ExpiFectamine™ se añadió de inmediato lentamente a la solución del plásmido. La mezcla se invirtió para mezclarla bien. La solución mezclada de plásmido y reactivo de transfección se añadió lentamente gota a gota mientras se agitaba el matraz. Las células se cultivaron en un agitador con un 8% de CO₂ a 37 °C durante 8–9 días. La viabilidad celular se comprobó después de 8 días.

El cultivo se recogió y se centrifugó a 3300 g durante 10 min, y a continuación se recogió el sobrenadante y se centrifugó a velocidad alta para eliminar las impurezas. Se equilibró una columna de gravedad (Bio-Rad, 7311550) que contenía MabSelect™ (GE Healthcare Life Science, 71-5020-91 AE) con PBS (pH 7.4) y se lavó con 2–5 volúmenes de columna de PBS. La muestra del sobrenadante se cargó sobre una columna. La columna se lavó con 5–10 volúmenes de columna de PBS. La proteína diana se eluyó con glicina 0.1 M (pH 3.5). El eluido se ajustó a neutralidad con Tris-HCl (pH 8.0) y se concentró, y se realizó un intercambio del tampón a tampón PBS con un tubo de ultrafiltración (Millipore, UFC901024) para obtener una solución de anticuerpo purificado. A continuación, la solución de anticuerpo purificado se sometió a una determinación de la concentración utilizando NanoDrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One), se subenvasó y se almacenó para su uso posterior.

9.2. Caracterización de los anticuerpos mediante SEC-HPLC, HIC-HPLC y DSF

Una cantidad apropiada de la muestra purificada anterior se cargó sobre una columna de SEC analítica TSKgel G3000SWxl (modelo del sistema HPLC: 1260 Infinity II de Agilent) para medir la pureza. En este método, se utilizaron los siguientes parámetros y condiciones: fase móvil: 1×PBS, pH 7.4 (Sangon, E607016); temperatura ambiente; flujo: 1.0 mL/min; concentración de la muestra: 1 mg/mL; volumen de inyección: 20 µL; longitud de onda de detección: 280 nm. Después del registro, el cromatograma se integró utilizando el programa informático ChemStation y se calcularon los datos relevantes. Se generó un análisis, con los tiempos de retención reportados para los diferentes componentes de la muestra.

Una cantidad apropiada de la muestra purificada anterior se cargó sobre una columna de HIC analítica TSKge1 Butyl-NPR 4.6*35 (modelo del sistema HPLC: 1260 Infinity II de Agilent) para medir la pureza y la hidrofobia. El método consistía en un gradiente lineal de un 100% de la fase móvil A (PB 20 mM, (NH₄)₂SO₄ 1.8 M, pH 6.0) a un 100% de la fase móvil B (PB 20 mM, pH 6.0) en 16 min. El flujo se fijó en 0.7 mL/min, la concentración de la muestra era de 1 mg/mL, el volumen de inyección era de 20 µL y la longitud de onda de detección era de 280 nm. Después del registro, el cromatograma se integró utilizando el programa informático

ChemStation y se calcularon los datos relevantes. Se generó un análisis, con los tiempos de retención reportados para los diferentes componentes de la muestra.

En este ejemplo, se midió la temperatura de desnaturalización térmica (T_m) de una molécula proteínica mediante fluorimetría diferencial de barrido (FDB). Se añadieron 10 μg de proteína a una placa de PCR de 96 pocillos (Thermo, AB-0700/W), tras lo cual se añadieron 2 μL de tinte SYPRO™ (Invitrogen, 2008138) diluido 100 $\times$ y a continuación se añadió tampón para obtener un volumen final de 40 μL por pocillo. La placa de PCR se selló, se introdujo en un instrumento de PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real (sistema CFX96 PCR de Bio-Rad), se incubó a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, a continuación se calentó gradualmente desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 95 $^{\circ}\text{C}$ en un gradiente de 0.2 $^{\circ}\text{C}/0.2$ min y se enfrió hasta 25 $^{\circ}\text{C}$ al final de la prueba. Se utilizó el modo de barrido FRET y se realizó un análisis de datos utilizando el programa informático CFX Maestro de Bio-Rad para calcular la T_m de la muestra. Los resultados de la caracterización anterior se muestran a continuación en la Tabla 17.

Tabla 17. Caracterización de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3

Anticuerpo	Pureza según SEC-HPLC (%)	Pureza según HIC-HPLC (%)	Tiempo de retención según HIC-HPLC (min)	T_m1 ($^{\circ}\text{C}$)	T_m2 ($^{\circ}\text{C}$)
PR004549	93.4	100.0	19.0	56.0	ND
PR004603	100.0	100.0	19.2	50.0	66.8
PR005072	99.1	100.0	16.4	59.0	64.2
PR005076	97.8	92.1	18.3	50.2	66.8
PR005397	100.0	100.0	16.2	52.0	59.0
PR005398	98.9	100.0	16.7	54.2	67.8
PR005399	86.0	100.0	16.5	53.8	67.8
PR005401	99.6	100.0	16.1	60.0	67.4
PR005411	100.0	100.0	16.2	60.2	67.4
PR005422	99.7	100.0	18.0	48.4	66.4
PR005518	64.0	100.0	16.0	53.4	64.4
PR005519	68.9	100.0	15.9	53.4	64.2
PR005520	89.7	100.0	16.4	54.0	62.8
PR005521	89.0	100.0	16.3	54.8	62.6
PR005522	100.0	100.0	16.5	52.0	63.8
PR005525	99.7	100.0	16.4	63.2	66.4
PR005354	99.8				
PR006023	100.0	100.0	16.0	59.2	65.8
PR006292	99.4	100.0	15.9	59.6	66.8

PR006293	99.0	100.0	16.0	59.8	65.8
PR006384	100.0	100.0	15.9	59.2	67.0
PR007079	99.4	100.0	16.1	55.6	66.4
PR007080	97.8	100.0	16.0	59.6	66.8
PR007081	95.8	100.0	16.2	56.2	66.6
PR007082	98.5	86.10	16.1	60.8	66.8
PR007083	84.5	100.0	16.1	51.8	67.6
Trastuzumab	100.0	100.0	16.0	67.8	79.2

Ejemplo 10: Afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 a células

Se evaluó la afinidad de unión de los anticuerpos mediante FACS. Las células de prueba incluyen células HEK293/hCLDN18.2, HEK293/hCLDN18.1, NUGC4_D8 y Jurkat. La afinidad de unión se determinó del siguiente modo: se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min y a continuación se resuspendieron en tampón de FACS (PBS que contenía un 2% de FBS). La densidad celular se ajustó a 10^6 células/mL y se añadieron 50 μ L de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se diluyeron en concentraciones diferentes con tampón de FACS y se añadieron 50 μ L de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Después de 2 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. A continuación, se añadió un tampón de FACS que contenía un anticuerpo secundario anti-IgG humana producido en cabra conjugado con APC (concentración final de 1.5 μ g/mL, Jackson, 109-605-098). Después de 1 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. Las células se resuspendieron en solución fijadora y a continuación se monitoreó la fluorescencia de las células utilizando un instrumento FACS (ACEA NovoCyte). La FIG. 5 y la Tabla 18 muestran la afinidad de unión de los anticuerpos a las células. Todos los anticuerpos de prueba pueden unirse a células que expresan CLDN18.2 y CD3, y no se unen a células que expresan CLDN18.1.

Tabla 18. La afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 por células

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (nM)		
	NUGC4_D8	HEK293/hCLDN18.2	Jurkat
PR004549	ND	50.4	3.6
PR004603	ND	33.1	ND
PR005072	90.7	15.7	ND
PR005076	ND	ND	ND
PR005397	27.5	12.8	ND
PR005398	19.4	20.4	ND

	PR005399	ND	25.3	81.9
	PR005401	13.1	17.5	ND
	PR005411	20.5	16.0	85.9
	PR005422	ND	ND	ND
5	PR005518	20.5		ND
	PR005519	13.9		ND
	PR005520	13.9		ND
	PR005521	13.9		ND
	PR005522	13.9		ND
10	PR005525	12.6		26.8
	PR005354	12.6		ND
	PR006023	31.3		40.6
	PR006292	70.1	11.5	ND
	PR006293	78.0		65.0
15	PR006384	51.4	14.4	ND
	PR007079	73.2	ND	ND
	PR007080	46.7	ND	ND
	PR007081	49.3	ND	ND
	PR007082	44.2	ND	41.0
20	PR007083	ND	9.6	ND

Nota: los espacios en blanco en la tabla indican que la molécula no se sometió a un ensayo de afinidad por células HEK293/hCLDN18.2; ND indica la imposibilidad de obtener la CE₅₀ mediante ajuste para la molécula en un ensayo de afinidad por células HEK293/hCLDN18.2.

25

Ejemplo 11: Actividad TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Se evaluó la eficacia TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 frente a células NUGC4_D4, SNU620, IM95 y HEK293/hCLDN 18.1 utilizando un kit de ensayo de la citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Se aislaron linfocitos T a partir de PBMC humanas utilizando un kit de aislamiento de linfocitos T totales humanos (Miltenyi, 130-096-535). Los linfocitos T humanos y las células diana se resuspendieron en el medio (RPMI1640 + 5% de FBS). Se ajustó la densidad de las células diana a 3×10^5 células/mL y se ajustó la densidad de los linfocitos T a 1.2×10^6 /mL. Se añadieron 50 µL de cada tipo de las células a los pocillos de una placa de 96 pocillos (relación de efectoras respecto a diana de 4:1). Se diluyó un anticuerpo de prueba con medio (RPMI1640+5% de FBS) en concentraciones diferentes y se añadieron 50 µL a los pocillos de la placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 48 h y después se añadió lisado Triton-X

35

100 10× (RPMI1640 + 5% de FBS + 10% de Triton-X 100) al pocillo de control para la liberación de LDH máxima de las células diana y el pocillo de control para la corrección del volumen. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 0.5 h. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 400 g durante 4 min. Se extrajeron 50 µL del sobrenadante y después se añadió la solución cromogénica de LDH en una concentración de 50 µL/pocillo. Después de dejar reposar la mezcla en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 20 min, la placa se leyó en un MD StakMax (DO₄₉₀). Se utilizó PR004549 como control positivo para las células diana de CLDN18.2, PR004313 como control positivo para las células diana de CLDN18.1 y anticuerpo PR004312 como control negativo. Para calcular los resultados, se calcularon primero las lecturas corregidas. La lectura del pocillo de control del ruido de fondo medio se sustrajo de las lecturas de los pocillos experimentales, del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana y del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras, y a continuación la lectura del pocillo de control para la corrección del volumen se sustrajo de la lectura del pocillo de control para liberación de LDH máxima de las células diana. Actividad TDCC (%) = (lectura corregida del pocillo experimental - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana)/(lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH máxima de las células diana - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana) × 100. La FIG. 6 muestra la actividad TDCC de los anticuerpos de prueba y los valores se detallan en la Tabla 19. En las células NUGC4_D8 con expresión endógena alta de CLDN18.2, los anticuerpos de prueba pueden inducir una actividad TDCC más alta o comparable en comparación con PR004549. En cambio, en las células IM95 con expresión baja de CLDN18.2, los anticuerpos de prueba inducen actividad TDCC inferior en comparación con PR004549. Las células SNU620 tienen una mutación de metionina a leucina en el aminoácido 149 de CLDN18.2, que representa un subconjunto de pacientes con cáncer gástrico con la mutación de CLDN18.2, y los anticuerpos de prueba pueden inducir una actividad TDCC más alta o comparable en comparación con PR004549. Los anticuerpos de prueba no consiguieron desencadenar un efecto TDCC frente a células HEK293/hCLDN 18.1.

Tabla 19. La actividad TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (pM)		
	NUGC4_D8	IM95	SNU620
PR004549	32.0-502	109-159	55.9-66.2
PR004603	251	ND	17.8
PR005072	142	ND	34.5
PR005076	102		

5	PR005397	10.0	ND	31.6
	PR005398	9.00	ND	18.3
	PR005399	14.8		41.1
	PR005401	6.40		25.8
	PR005411	11.0	ND	38.5
10	PR005422	21.9	ND	313.0
	PR005518	30.6		
	PR005519	32.9	ND	70.5
	PR005520	22.4		
	PR005521	73.9	ND	41.0
15	PR005522	186		
	PR005525	28.9		
	PR005354	11.0		
	PR006023	48.5		
	PR006292	185	ND	112.7
20	PR006293	87.0	460	18.5
	PR006384	57.9	938	57.1

Ejemplo 12: Afinidad de unión de los anticuerpos a proteínas receptoras Fc humanas mediante el método BLI

Se analizó la cinética de unión entre proteínas y anticuerpos mediante la técnica de interferometría de biocapa (BLI, por sus siglas en inglés) utilizando un sistema Octet Red 96e (Fortebio). La velocidad de rotación se fijó a 1000 rpm para el sistema. Se diluyó el tampón de cinética 10× (ForteBio, N.º de Cat. 18-1105) hasta tampón de cinética 1× para el ensayo de afinidad y la dilución de las muestras. El sensor FAB2G (Fortebio, 18-5125) colocado en línea se equilibró en un tampón de prueba durante 10 min y después se utilizó para capturar anticuerpos (PR002725, PR005397, PR006384, PR005411, PR006292, PR006023 y PR006293) a una altura de captura de 1 nm. Tras equilibrar en el tampón durante 120 s, se dejó que el sensor FAB2G se uniera a la proteína receptora Fc humana diluida en serie al 2%. La concentración de la proteína y el tiempo de disociación y unión se muestran en la Tabla 20. Por último, el sensor FAB2G se sumergió en una solución de glicina-ácido clorhídrico 10 mM a pH 1.5 para su regeneración para eluir las proteínas unidas al sensor. Los ensayos de afinidad de los anticuerpos por FcRn se realizaron en las condiciones de tanto tampón de pH 6.0 como tampón de pH 7.4. Para PR004549, el sensor de captura es ProL (Fortebio, 18-5085). Cuando se realizó un análisis de datos utilizando el programa informático Octet Data Analysis (Fortebio, versión 11.0), se utilizó 0 nM como hueco de referencia y se realizó la sustracción de la referencia; se seleccionó el método “ajuste global 1:1” para ajustar los datos y se calcularon los

parámetros cinéticos de la unión de las proteínas a los anticuerpos, con los valores de k_{on} (1/Ms), valores de k_{dis} (1/s) y valores de $KD(M)$ obtenidos. Para las interacciones de unión rápida y disociación rápida, se seleccionó el método “en equilibrio” para ajustar los datos para obtener los valores de $KD(M)$. La afinidad de unión de los anticuerpos a las proteínas receptoras Fc humanas se muestra en la Tabla 21.

Tabla 20. Información sobre las proteínas receptoras Fc y parámetros experimentales

Proteína receptora Fc	N.º de catálogo	Fabricante	Concentración de prueba (nM)	Tiempo de unión/tiempo de disociación
CD64 humana	CM60	NovoProtein Scientific Co., Ltd.	200-12.5*	60 s/20 s
FcRn humano	CI01		400-25 (pH 6.0) 1000-62.5 (pH 7.4)	60 s/20 s
CD32a humana	CS35		10000-625	30 s/20 s
CD32b humana	C444		10000-625	30 s/20 s
CD16a(F) humana	CS11		10000-625	60 s/20 s
CD16a(V) humana	C441		6000-375	60 s/20 s

*Para el anticuerpo PR002725, la concentración de prueba de CD64 era de 40–1.25 nM

Tabla 21. La afinidad de unión de los anticuerpos a las proteínas receptoras Fc humanas

Receptor Fc	Anticuerpo	Concentración (nM)	KD(M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	R ² completo
CD64 humana	PR002725	40-1.25	9.13E-11	1.42E+06	1.30E-04	0.9978
	PR004549	200-25	9.62E-06	6.00E+04	5.77E-01	0.9814
	PR005397	200-12.5	5.06E-08	8.66E+05	4.38E-02	0.9951
	PR006384	800-50	ND ¹			
	PR005411	200-12.5	4.71E-08	8.85E+05	4.17E-02	0.9934
	PR006292	800-50	ND ¹			
	PR006023	200-12.5	5.39E-08	8.74E+05	4.71E-02	0.9952
	PR006293	800-50	ND ¹			
CD16a(V) humana	PR002725	400-25	1.29E-07	5.85E+05	7.57E-02	0.9944
	PR004549	6000-375	ND ¹			

5		PR005397	6000-375	1.80E-06	ND ²	ND ²	0.9218
		PR006384	6000-375	ND ¹			
		PR005411	6000-375	2.30E-06	ND ²	ND ²	0.9126
		PR006292	6000-375	ND ¹			
		PR006023	6000-375	3.00E-06	ND ²	ND ²	0.9002
		PR006293	6000-375	ND ¹			
10 15	CD16a(F) humana	PR002725	10000-625	2.10E-06	ND ²	ND ²	0.9884
		PR004549		ND ¹			
		PR005397					
		PR006384					
		PR005411					
		PR006292					
		PR006023					
		PR006293					
20	FcRn humano pH 6.0	PR002725	400-25	1.55E-07	3.46E+05	5.37E-02	0.9906
		PR004549	400-25	2.06E-07	2.80E+05	5.77E-01	0.9852
		PR005397	400-25	1.82E-07	3.22E+05	5.86E-02	0.9907
		PR006384	400-25	2.10E-07	2.89E+05	6.08E-02	0.9898
		PR005411	400-25	2.15E-07	3.00E+05	6.44E-02	0.9879
		PR006292	400-25	2.00E-07	3.05E+05	6.09E-02	0.9895
		PR006023	400-25	2.10E-07	2.98E+05	6.26E-02	0.9889
		PR006293	400-25	2.17E-07	2.91E+05	6.32E-02	0.9886
25 30	FcRn humano pH 7.4	PR002725	1000-62.5	ND ¹			
		PR004549					
		PR005397					
		PR006384					
		PR005411					
		PR006292					
		PR006023					
		PR006293					
35	CD32a(H) humana	PR002725	10000-625	7.40E-07	ND ²	ND ²	0.9828
		PR004549		ND ¹			
		PR005397					
		PR006384					

5		PR005411					
		PR006292					
		PR006023					
		PR006293					
10	CD32b humana	PR002725	10000-625	2.60E-06	ND ²	ND ²	0.9981
		PR004549		ND ¹			
		PR005397					
		PR006384					
		PR005411					
		PR006292					
		PR006023					
		PR006293					

ND¹: No hay unión del anticuerpo a la proteína

ND²: El anticuerpo se une a la proteína receptora en un modo de unión rápida y disociación rápida; el método de ajuste adoptado es el ajuste en equilibrio, sin valores de k_{on}/k_{dis} .

Ejemplo 13: Afinidad de unión de los anticuerpos a proteínas CD3 de especies diferentes mediante el método BLI

Se analizó la cinética de unión entre proteínas y anticuerpos mediante la técnica de interferometría de biocapa (BLI) utilizando un sistema Octet Red 96e (Fortebio). Se mezclaron CD3E humana (Acro, CDE-H5223), CD3E de macaco (Acro, CDE-C5226) y CD3E murina (Acro, CDE-M5256) con biotina (Thermo Scientific, A39257) en una relación molar de 1:3. La mezcla se incubó a 4 °C durante la noche y después se eliminó la biotina en exceso para obtener CD3E biotinilada. La velocidad de rotación se fijó a 1000 rpm para el sistema. Se diluyó el tampón de cinética 10× (ForteBio, N.º de Cat. 18-1105) hasta tampón de cinética 1× para el ensayo de afinidad y la dilución de las muestras. El sensor SA (Fortebio, 18-5019) colocado en línea se equilibró en un tampón de prueba durante 10 min y después se utilizó para capturar CD3 con un marcador de biotina o CD3 biotinilada a una altura de captura de 0.2 nm. Después de equilibrar en el tampón durante 120 s, se dejó que el sensor SA con CD3 capturada se uniera a anticuerpos diluidos en serie al 2%. La concentración del anticuerpo se muestra en la Tabla 22, y los tiempos de unión y disociación se fijaron a 180 s y 300 s. Por último, el sensor SA se sumergió en una solución de glicina-ácido clorhídrico 10 mM a pH 1.5 para su regeneración para eluir los anticuerpos unidos al sensor. El anticuerpo anti-CD3e 48-2B (santa cruz biotechnology, s SC-1174) es un anticuerpo positivo murino. Cuando se realizó un análisis de datos utilizando el programa informático Octet Data Analysis (Fortebio, versión 11.0), se utilizó 0 nM como hueco de referencia y se realizó la sustracción de la referencia; se seleccionó

el método “ajuste global 1:1” para ajustar los datos y se calcularon los parámetros cinéticos de la unión de las proteínas a los anticuerpos, con los valores de k_{on} (1/Ms), valores de k_{dis} (1/s) y valores de $KD(M)$ obtenidos. Para las interacciones de unión rápida y disociación rápida, se seleccionó el método “en equilibrio” para ajustar los datos para obtener los valores de $KD(M)$.

- 5 La afinidad de unión de los anticuerpos a las proteínas CD3 de diferentes especies se muestra en la Tabla 23. PR002199 se derivó del anticuerpo biespecífico anti-BCMA(TNB308902)×CD3(TNB_F2B) en la patente WO2018052503 de Teneobio. PR004931 se derivó del anticuerpo biespecífico anti-CEA×CD3 en la patente WO2017055389A1 de Roche.

10 Tabla 22. Información sobre las proteínas receptoras CD3 y parámetros experimentales

Proteína	N.º de catálogo	Fabricante
CD3E&D humana biotinilada	CDD-H82W6	Acro biosystems
CD3Ec humana	CDE-H5223	
CD3E&D de macaco biotinilada	CDD-C82W6	
CD3E de macaco	CDE-C5226	
CD3E&D murina biotinilada	CDD-M82W5	

Tabla 23. La afinidad de unión de los anticuerpos a las proteínas CD3 de diferentes especies

Proteína	Anticuerpo	Concentración (nM)	KD(M)	k_{on} (1/Ms)	k_{dis} (1/s)	R ² completo
CD3E humana	PR004549	20-1.25	4.10E-09	1.59E+05	6.52E-04	0.9986
	PR004931	100-6.25	3.08E-08	7.31E+04	2.25E-03	0.9992
	PR006292	100-6.25	9.90E-08	9.89E+04	9.78E-03	0.9971
	PR006293	100-6.25	3.17E-08	6.81E+04	2.16E-03	0.9993
	PR006384	100-6.25	1.51E-07	8.54E+04	1.29E-02	0.9981
CD3E&D humana biotinilada	PR002199	200-12.5	2.41E-07	2.15E+05	5.18E-02	0.9834
	PR004549	30-1.875	6.15E-09	9.65E+04	5.93E-04	0.9988
	PR004931	100-6.25	3.37E-08	4.07E+04	1.37E-03	0.9973
	PR006292	100-6.25	1.44E-07	8.47E+04	1.22E-02	0.9972
	PR006384	100-6.25	1.32E-07	9.02E+04	1.19E-02	0.9985
CD3E de macaco	PR004549	20-1.25	9.75E-09	4.03E+04	3.93E-04	0.9998
	PR004931	100-6.25	2.59E-08	7.03E+04	1.82E-03	0.9995
	PR006292	100-6.25	1.40E-07	7.51E+04	1.05E-02	0.9952
	PR006293	100-6.25	3.24E-08	6.07E+04	1.97E-03	0.9995
	PR006384	100-6.25	1.65E-07	7.40E+04	1.22E-02	0.9970
CD3E&D de	PR004549	30-1.875	1.30E-08	1.79E+04	2.33E-04	0.9995

5	macaco biotinilada	PR004931	100-6.25	2.13E-08	4.16E+04	8.83E-04	0.9972
		PR006292	100-6.25	1.13E-07	8.57E+04	9.65E-03	0.9991
		PR006384	100-6.25	1.52E-07	6.22E+04	9.42E-03	0.9986
	CD3E&D murina biotinilada	anti-CD3e(48-2B)	40-2.5	1.71E-10	8.03E+05	1.37E-04	0.9940
		PR004549	120-7.5	ND ¹			
		PR006384	120-7.5				
		PR006292	120-7.5				
		PR004931	120-7.5				

ND¹: No hay unión del anticuerpo a la proteína

Ejemplo 14: Afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 a proteínas parálogas de CLDN18.2 humana

Se evaluó la afinidad de unión de los anticuerpos a proteínas parálogas de la CLDN18.2 humana mediante FACS (ACEA NovoCyte). Se transfectaron de forma transitoria genes CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 de la familia de parálogos de la CLDN18.2 humana en células HEK293. La información sobre los plásmidos se muestra en la Tabla 24. La afinidad de unión se determinó del siguiente modo: se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min y a continuación se resuspendieron en tampón de FACS (PBS que contenía un 2% de FBS). La densidad celular se ajustó a 10⁶ células/mL y se añadieron 50 µL de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Un anticuerpo se diluyó a 60 nM con tampón de FACS y se añadieron 50 µL de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Después de 2 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. A continuación, se añadió un tampón de FACS que contenía un anticuerpo secundario. Después de 1 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. Las células se resuspendieron en solución fijadora y se realizó un análisis FACS. La información sobre el anticuerpo de control positivo, anticuerpo de control negativo y anticuerpo secundario se muestra en la Tabla 25. PR005080 era el anticuerpo clon 1A2 (de fabricación propia, véase el documento EP3567053A1) utilizado como control positivo para la unión a CLDN2. Los resultados de FACS se muestran en la FIG. 7, que muestra que no había ninguna unión inespecífica de PR006384 y PR006292 a CLDN1, CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN6 y CLDN9 de la proteína de la familia de proteínas parálogas de la CLDN18.2 humana.

Tabla 24. Información sobre los plásmidos de expresión de genes parálogos de CLDN18.2

Nombre	Proveedor	N.º de catálogo
pcDNA3.1_hCLDN9_NM_020982	genscript	NM_020982.4
pcDNA3.1_hCLDN6_NM_021195	genscript	NM_021195.5
pcDNA3.1_hCLDN4_NM_001305	genscript	NM_001305.4

pcDNA3.1_hCLDN3_NM_001306	genscript	NM_001306.4
pcDNA3.1_hCLDN2_NM_001171092	genscript	NM_001171092.1
pcDNA3.1_hCLDN1_NM_021101	genscript	NM_021101.5

Tabla 25. Información sobre los anticuerpos de la citometría de flujo

5

Nombre	Proveedor	N.º de catálogo
Anticuerpo contra Claudina-1 humana	R&D	MAB4618
Anticuerpo contra Claudina-3 humana	R&D	MAB4620
Anticuerpo contra Claudina-4 humana	R&D	MAB4219
10 Anticuerpo contra Claudina-6 humana	R&D	MAB3656
Anticuerpo contra Claudina-9 humana	antibodies-online	ABIN1720917
IgG2A de rata	R&D	MAB006
IgG2A de ratón	R&D	MAB003
IgG2B de ratón	R&D	MAB004
15 IgG2B de rata	R&D	MAB0061
Anticuerpo contra Claudina-2 humana (PR005080)	De fabricación propia	
Iso hIgG1	CrownBio	C0001-4
20 Anticuerpo anti-IgG humana producido en cabra-Alexa Fluor® 647 AffiniPure, específico del fragmento Fcγ	Jackson	109-605-098
Anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra-Alexa Fluor® 647 AffiniPure (subclases 1+2a+2b+3), específico del fragmento Fcγ	Jackson	115-605-164
25 Anticuerpo anti-IgG de rata producido en cabra-Alexa Fluor® 647 AffiniPure, específico del fragmento Fcγ	Jackson	112-605-071

Ejemplo 15: Afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 a proteínas diana de macaco

30

Se evaluó la afinidad de unión de los anticuerpos mediante FACS. Las células de prueba incluyen células HEK293 que expresan CLDN18.2 de macaco (HEK293/cynoCLDN18.2), células HEK293 que sobreexpresan CLDN18.1 de macaco (HEK293/cynoCLDN18.1) y linfocitos T positivos para CD3 de macaco. Se aislaron linfocitos T positivos para CD3 a partir de PBMC de macaco utilizando un kit de aislamiento de células para CD3 de primate no humano (Miltenyi, 130-092-012). La afinidad de unión se determinó del siguiente modo: se centrifugaron las células a 300 g durante 5 min y a continuación se

35

resuspendieron en tampón de FACS (PBS que contenía un 2% de FBS). La densidad celular se ajustó a 10^6 células/mL y se añadieron 50 μ L de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se diluyeron en concentraciones diferentes con tampón de FACS y se añadieron 50 μ L de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Después de 2 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. A continuación, se añadió un tampón de FACS que contenía un anticuerpo secundario anti-IgG humana producido en cabra conjugado con APC (concentración final de 1.5 μ g/mL, Jackson, 109-605-098). Después de 1 h de incubación a 4 °C, la placa se lavó dos veces con tampón de FACS. Las células se resuspendieron en solución fijadora y se realizó un análisis FACS (ACEA NovoCyte). La FIG. 8 y la Tabla 26 muestran la afinidad de unión de los anticuerpos a células HEK293 que sobreexpresaban CLDN18.1 y CLDN18.2 de macaco, así como linfocitos T positivos para CD3 en PBMC de macaco. Todos los anticuerpos de prueba pueden unirse a células que expresan CLDN18.2 y CD3, y no se unen a células que expresan CLDN18.1.

Tabla 26. La afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 a células

Anticuerpo	Título CE ₅₀ (nM)	
	HEK293/cynoCLDN18.2	Linfocito T CD3+
PR004549	62.8	
PR005411	11.1	
PR006292	8.50	ND
PR006384	11.7	
PR000400	6.50	

Ejemplo 16: Actividad TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 frente a células que expresan CLDN18.2 de macaco

Se evaluó la actividad de desencadenar un efecto TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 frente a HEK293/cynoCLDN18.2 utilizando un kit de ensayo de la citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Se aislaron linfocitos T positivos para CD3 a partir de PBMC de macaco utilizando un kit de aislamiento de células para CD3 de primate no humano (Miltenyi, 130-092-012). Los linfocitos T de macaco y las células diana se resuspendieron en el medio (RPMI1640 + 5% de FBS). Se ajustó la densidad de las células diana a 3×10^5 células/mL y se ajustó la densidad de los linfocitos T a 1.2×10^6 /mL. Se añadieron 50 μ L de cada tipo de las células a los pocillos de una placa de 96 pocillos (relación de efectoras respecto a diana de 4:1). Se diluyó un anticuerpo de prueba con medio (RPMI1640+5% de FBS) en concentraciones diferentes y se añadieron 50 μ L a los

pocillos de la placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h y después se añadió lisado Triton-X 100 10× (RPMI1640 + 5% de FBS + 10% de Triton-X 100) al pocillo de control para la liberación de LDH máxima de las células diana y el pocillo de control para la corrección del volumen. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 0.5 h. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 400 g durante 4 min. Se extrajeron 50 µL del sobrenadante y después se añadió la solución cromogénica de LDH en una concentración de 50 µL/pocillo. Después de dejar reposar la mezcla en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 20 min, la placa se leyó en un MD StakMax (DO₄₉₀). Para calcular los resultados, se calcularon primero las lecturas corregidas. La lectura del pocillo de control del ruido de fondo medio se sustrajo de las lecturas de los pocillos experimentales, del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana y del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras, y a continuación la lectura del pocillo de control para la corrección del volumen se sustrajo de la lectura del pocillo de control para liberación de LDH máxima de las células diana. Actividad TDCC (%) = (lectura corregida del pocillo experimental - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana)/(lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH máxima de las células diana - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana) × 100. La FIG. 9 muestra la actividad TDCC inducida por los anticuerpos frente a HEK293/cynoCLDN18.2. Los valores específicos se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. La actividad TDCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Anticuerpo	CE ₅₀ (pM)
	HEK293/cynoCLDN18.2
PR006292	76.8

25 Ejemplo 17: Ensayo de liberación de citocinas *In Vitro*

Se evaluó la liberación de citocinas inducida *in vitro* de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 utilizando PBMC humanas, para predecir la seguridad de los anticuerpos. Se incubaron PBMC con anticuerpos ya sea en presencia o ausencia de células HEK293/hCLDN18.1. Las PBMC y HEK293/hCLDN18.1 se resuspendieron en el medio (RPMI1640 + 10% de FBS). Se ajustó la densidad de las células HEK293/hCLDN18.1 a 1.5×10^6 células/mL y se ajustó la densidad celular de las PBMC a 2×10^6 /mL. Se añadieron 100 µL de células HEK293/hCLDN18.1 y 200 µL de PBMC a los pocillos de una placa de 48 pocillos. Se diluyeron los anticuerpos de prueba con medio (RPMI1640+10% de FBS) en concentraciones diferentes y se añadieron 100 µL a los pocillos de la placa de 48 pocillos hasta un volumen final de 400 µL. Se utilizó LPS (Sigma, L6529) como control positivo. Se utilizó el anticuerpo Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) como control negativo. Las muestras se incubaron a

37 °C durante 24 h. El sobrenadante se centrifugó a 300 g durante 10 min y se recogieron 300 µL del sobrenadante. Las concentraciones de IL-6 (Invitrogen, 88-7066) y TNF-α (Invitrogen, 88-7346) en el sobrenadante se cuantificaron por ELISA. La FIG. 10 muestra la liberación de citocinas inducida por los anticuerpos *in vitro*. La liberación de IL-6 y TNF-α inducida por PR004549 es más alta que la inducida por PR006292 en ausencia de células diana de CLDN18.2, lo cual indica que el perfil de seguridad de PR006292 es mejor

Ejemplo 18: Actividad ADCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Se evaluó la actividad de desencadenar un efecto ADCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3 frente a células Jurkat y HEK293/hCLDN 18.2 utilizando un kit de ensayo de la citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® (Promega, G1780). Se centrifugaron PBMC humanas a 300 g durante 10 min y se cultivaron en un medio (RPMI1640 + 10% de FBS) durante la noche. Se aislaron linfocitos NK a partir de las PBMC humanas utilizando un kit de aislamiento de linfocitos NK humanos (Miltenyi, 130-092-657). Las células Jurkat se centrifugaron a 300 g durante 5 min y los linfocitos NK humanos a 300 g durante 10 min. A continuación, las células se resuspendieron en el medio (RPMI1640 + 5% de FBS). Se ajustó la densidad de las células diana a 3×10^5 células/mL y se ajustó la densidad de los linfocitos NK a 1.8×10^6 /mL. Se añadieron 50 µL de cada tipo de las células a los pocillos de una placa de 96 pocillos (relación de efectoras respecto a diana de 6:1). Se diluyeron los anticuerpos de prueba con medio (RPMI1640+5% de FBS) en concentraciones diferentes y se añadieron 50 µL a los pocillos de la placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 h y después se añadió lisado Triton-X 100 10× (RPMI1640 + 5% de FBS + 10% de Triton-X 100) al pocillo de control para la liberación de LDH máxima de las células diana y el pocillo de control para la corrección del volumen. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 37 °C durante 0.5 h. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 300 g durante 5 min. Se extrajeron 50 µL del sobrenadante y después se añadió la solución cromogénica de LDH en una concentración de 50 µL/pocillo. Después de dejar reposar la mezcla en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 20 min, la placa se leyó en un MD StakMax (DO₄₉₀). Se utilizó PR003767 como control positivo y el anticuerpo Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) como control negativo. Para calcular los resultados, se calcularon primero las lecturas corregidas. La lectura del pocillo de control del ruido de fondo medio se sustrajo de las lecturas de los pocillos experimentales, del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana y del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras, y a continuación la lectura del pocillo de control para la corrección del volumen se sustrajo de la lectura del pocillo de control para liberación de LDH máxima de las células diana. Actividad ADCC (%) = (lectura corregida del pocillo experimental - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células efectoras - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana)/(lectura corregida del pocillo de control

para la liberación de LDH máxima de las células diana - lectura corregida del pocillo de control para la liberación de LDH espontánea de las células diana) $\times 100$. La FIG. 11(a) muestra la actividad ADCC de los anticuerpos frente a células Jurkat. PR006292 y PR004549 fueron incapaces de desencadenar efectos ADCC frente a células Jurkat.

5 Se evaluó la actividad de desencadenar un efecto ADCC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 frente a NUGC4_D8 utilizando células NK92/CD16a. NUGC4_D8 y NK92/CD16a se resuspendieron en un medio (RPMI1640 + 5% de FBS). Se ajustó la densidad de las células diana a 3×10^5 células/mL y se ajustó la densidad de las células NK92/CD16a a 1.8×10^6 /mL. Se añadieron 50 μ L de cada tipo de las células a los
10 pocillos de una placa de 96 pocillos (relación de efectoras respecto a diana de 6:1). Se diluyeron los anticuerpos de prueba con medio (RPMI1640+5% de FBS) en concentraciones diferentes y se añadieron 50 μ L a los pocillos de la placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 h. PR003197 se utilizó como control positivo. La FIG. 11(b) muestra la actividad ADCC de los anticuerpos frente a NUGC4_D8. PR006292 y PR004549
15 fueron incapaces de desencadenar efectos ADCC frente a células NUGC4_D8.

Ejemplo 19: Actividad CDC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3

Se evaluaron los efectos CDC de los anticuerpos CLDN18.2 frente a células HEK293/hCLDN18.2 y Jurkat utilizando un kit de ensayo de la viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, G7573). Las células diana se centrifugaron a 300 g durante 5 min y
20 después se resuspendieron en medio exento de suero RPMI1640. La densidad de las células diana se ajustó a 2×10^5 células/mL y se añadieron 25 μ L de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los anticuerpos se diluyeron en concentraciones diferentes con el medio exento de suero y se añadieron 25 μ L de la dilución del anticuerpo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 μ L de suero humano normal (cultivo celular Access,
25 515) hasta una concentración final del 50% y la mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 24 h. La placa de 96 pocillos se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y se añadieron 100 μ L de solución cromogénica CellTiter-Glo a cada pocillo a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se incubó en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 10 min. La placa se leyó con PE Enspire. Actividad CDC (%) = $[1 - (\text{muestra luminiscente})/(\text{control simulado luminiscente})] \times 100$. Se utilizó un análogo de IMAB362 como control positivo y el anticuerpo Iso hIgG1 (CrownBio, C0001-4) como control negativo. La FIG. 12 muestra la actividad CDC del anticuerpo PR006292 frente a células Jurkat y células HEK293 que sobreexpresaban CLDN18.2 humana. PR006292 indujo un efecto CDC mayor que el inducido por PR004549 en HEK293/hCLDN18.2, mientras que no se observó actividad
30 CDC en las células Jurkat. La actividad CDC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2 $\times$ CD3 se muestra específicamente en la Tabla 28.

Tabla 28. La actividad CDC de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Célula		PR006292	PR004549
HEK293/hCLDN18.2	Tasa de destrucción máxima (%)	71.8	0.00
	CE ₅₀ (nM)	37.1	ND
Jurkat	Tasa de destrucción máxima (%)	0.00	0.00
	CE ₅₀ (nM)	ND	ND

Ejemplo 20: Actividad de unión competitiva de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Este ejemplo es para estudiar la unión de los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN18.2 humana a la región epitópica de un antígeno CLDN18.2 humana. Se realizaron experimentos de unión competitiva al nivel celular utilizando células HEK293/hCLDN18.2 que sobreexpresaban CLDN18.2 humana. Resumiendo, se biotinilaron los anticuerpos anti-CLDN18.2 humana PR000400 y PR004549 utilizando un kit de biotinilación (ThermoFisher, A35358) de acuerdo con las instrucciones. A una placa con fondo en V de 96 pocillos (Corning, 3894) se añadieron células en una densidad de 2×10^6 células/mL y una suspensión de células HEK293T/hCLDN18.2 que sobreexpresaban CLDN18.2 humana en una concentración de 50 μ L/pocillo, tras lo cual se añadieron 25 μ L de anticuerpo anti-CLDN18.2 humana PR000400 o PR004549 biotinilado. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 4 °C durante 30 min. Se añadieron 25 μ L del anticuerpo anti-CLDN18.2 humana sin biotinilar diluido en serie correspondiente. La mezcla se mezcló bien y se incubó a 4 °C durante 1 h. Las células de cada pocillo se lavaron dos veces con 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente (2% de BSA en DPBS) y se centrifugaron a 500 g a 4 °C durante 5 min, y después se descartó el sobrenadante. Se añadió un anticuerpo secundario fluorescente (Jackson ImmunoResearch, 016-540-084, 1:500). La mezcla se incubó a 4 °C en ausencia de luz durante 1 h. Las células de cada pocillo se lavaron dos veces con 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente (2% de BSA en DPBS) y se centrifugaron a 500 g a 4 °C durante 5 min, y después se descartó el sobrenadante. Por último, las células de cada pocillo se resuspendieron en 200 μ L de tampón de FACS enfriado previamente, y los valores de la señal de fluorescencia se leyeron utilizando un ACEA_NovoCyte. La tasa de inhibición se calculó utilizando la fórmula, tasa de inhibición (%) = $(A - B)/A \times 100$ (nota: A: señal de fluorescencia después de la interacción de anticuerpo biotinilado con ISO (hIgG1) (Crownbio, c0001-4); B: señal de fluorescencia después de la interacción de anticuerpo biotinilado con anticuerpo sin biotinilar).

Como se muestra en la FIG. 13 y la Tabla 29, los anticuerpos biespecíficos anti-CLDN18.2 de la presente invención son todos ellos capaces de bloquear la unión de

PR000400 o PR004549 a CLDN18.2 humana, y la capacidad de bloqueo detectada de los anticuerpos aumenta con la concentración de anticuerpo de un modo correlacionado positivamente, lo cual indica que estos anticuerpos tienen epítomos muy similares a los de PR000400 y PR004549. Los anticuerpos de prueba tienen una afinidad de unión baja por las células HEK293/hCLDN18.1. De los resultados anteriores, se puede inferir que los anticuerpos de prueba se unen a la proteína CLDN18.2 humana en ECL1 (bucle extracelular 1) en lugar de ECL2.

Tabla 29. La capacidad de unión competitiva de los anticuerpos contra CLDN18.2 frente a los anticuerpos PR000400 y PR004549

Anticuerpo	PR000400 biotinilado 10 nM		PR004549 biotinilado 200 nM	
	Cl ₅₀ (nM)	Tasa de inhibición máxima (%)	Cl ₅₀ (nM)	Tasa de inhibición máxima (%)
PR005397	81.8	98.4	67.5	48.0
PR006384	103	97.8	56.7	48.5
PR005411	122	96.2	74.4	48.0
PR006292	87.7	97.7	70.8	48.1
PR006293	132	97.8	100	48.0
PR000400	36.2	92.7	25.2	52.3
PR004549	ND	35.5	ND	16.7
ISO hIgG1	ND	0.00	ND	0.00

Ejemplo 21: Estudio de la farmacocinética de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Se llevaron a cabo estudios de la farmacocinética como se indica a continuación utilizando ratones atímicos BALB/c. Se seleccionaron 6 ratones atímicos BALB/c hembra que pesaban 18–22 g y se les administró una dosificación de anticuerpos mediante una inyección intravenosa en una dosis de 5 mg/kg. Se extrajo sangre completa de 3 ratones de un grupo antes de la administración y 15 min, 24 h (1 día), 4 días y 10 días después de la administración, y se extrajo sangre completa de 3 ratones del otro grupo antes de la administración y 5 h, 2 días, 7 días y 14 días después de la administración. La sangre completa se dejó reposar durante 30 min para que coagulara y después se centrifugó. La muestra de suero aislada se crioconservó a -80 °C hasta que se utilizó para el análisis. La concentración de fármaco en el suero murino se cuantificó mediante ELISA. El ELISA total (método total) se realizó capturando los anticuerpos que contenían Fc humano en el suero murino utilizando un anticuerpo policlonal anti-Fc humano producido en cabra y se detectaron mediante un anticuerpo secundario anti-Fc humano producido en cabra marcado con HRP. El ELISA del dominio de

unión a CLDN18.2 (Método X libre) se realizó capturando anticuerpos que contenían el dominio de unión a CLDN18.2 en el suero murino utilizando la proteína CLDN18.2 y se detectaron mediante un anticuerpo secundario anti-Fc humano producido en cabra marcado con HRP. Los datos de la concentración en plasma se analizaron utilizando el programa informático Phoenix WinNonlin (versión 8.2) mediante un análisis no compartimental (NCA, por sus siglas en inglés) para evaluar los parámetros farmacocinéticos.

La farmacocinética de PR006292, PR006384 y PR004549 se muestra en la FIG. 14, y los parámetros farmacocinéticos se muestran en la Tabla 30. PR006292 y PR006384 son superiores a PR004549 en estabilidad en los ratones, y tienen semividas largas y una alta cantidad de exposición al fármaco en los ratones.

Tabla 30. Parámetros farmacocinéticos de PR006292, PR006384 y PR004549

Método	PR004549		PR006292		PR006384	
	Ensayo total	Ensayo de dominio	Ensayo total	Ensayo de dominio	Ensayo total	Ensayo de dominio
$T_{1/2}$ (h)	7,395±606	5,714±464	7,395±606	5,714±464	6,352±325	5,751±192
V_d (mL/kg)	100	77.2	100	77.2	100	90.5
AUC_{todo} (µg/mL h)	106	94.1	106	94.1	106	89.7
AUC (%) [*]	121	132	121	132	141	112
CI (mL/h/kg)	0.5	0.73	0.5	0.73	0.59	0.76
C_0 (µg/mL)	173	135	173	135	198	130

^{*} AUC (%) = AUC/AUC (ensayo total; valor medio) × 100

Ejemplo 22: Estudios de la farmacodinámica *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos contra CLDN18.2×CD3

Modelo de tumor NUGC4_D8

Los estudios de la farmacodinámica *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratones NCG para recrear el modelo de tumor NUGC4_D8 del sistema inmunitario de PBMC humanas. El método es específicamente como se indica a continuación. El día de la inoculación de las células, cada ratón NCG se inoculó por vía subcutánea con células NUGC4_D8 y PBMC. Cuando el volumen tumoral medio de cada grupo de ratones alcanzó 90 mm³, los ratones se dividieron en grupos y se realizó un total de una administración a través de las venas de las colas. Tras el comienzo de la administración, se midieron el peso corporal y el volumen tumoral dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó del siguiente modo: volumen tumoral

$(\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{diámetro largo del tumor} \times \text{diámetro corto del tumor}^2$. Los datos se analizaron utilizando una prueba de la t .

Los efectos antitumorales *in vivo* de PR005397, PR005411 y PR004549 se muestran en la FIG. 15(a). Específicamente, el volumen tumoral medio del grupo de ratones de control tratado con Iso hlgG1 el día 25 después de la incubación era de 1897 mm³. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.2 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 104 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (por sus siglas en inglés) (%) del 94.48%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 538 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 71.61%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR005411 (0.2 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 30 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 98.39%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR005411 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 263 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 86.1%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR005397 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 327 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 82.75%. Durante todo el tratamiento, los animales mostraron una buena tolerancia a los fármacos, sin que se produjera una gran pérdida de peso ni el fallecimiento de los animales. Los efectos antitumorales *in vivo* de PR005397 y PR005411 son superiores a los de PR004549.

Los efectos antitumorales *in vivo* de PR006292, PR006293, PR006384 y PR004549 se muestran en la FIG. 15(b). Específicamente, el volumen tumoral medio del grupo de ratones de control tratado con Iso hlgG1 el día 25 después de la incubación era de 1355 mm³. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.2 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 408 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 69.83%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 743 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0037$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del

crecimiento tumoral TGI (%) del 45.15%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006293 (0.2 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 39 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 97.06%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006293 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 190 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 85.96%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006384 (0.2 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 81 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p < 0.0001$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 94%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006384 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 752 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0071$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 44.47%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006292 (0.04 mg/kg) el día 25 después de la inoculación era de 580 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0006$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 57.15%. Durante todo el tratamiento, los animales mostraron una buena tolerancia a los fármacos, sin que se produjera una gran pérdida de peso ni el fallecimiento de los animales. Los efectos antitumorales *in vivo* de PR006292, PR006293 y PR006384 son superiores a los de PR004549.

Modelo de tumor SNU620 PBMC

Los estudios de la farmacodinámica *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratones NCG para recrear el modelo de tumor SNU620 del sistema inmunitario de PBMC humanas. El método es específicamente como se indica a continuación. El día de la inoculación de las células, cada ratón NCG se inoculó por vía subcutánea con células tumorales SNU620. Cuando el volumen tumoral medio de cada grupo de ratones alcanzó 70 mm³, los ratones se dividieron en grupos y se realizaron un total de cuatro administraciones a través de las venas de las colas. Tras el comienzo de la administración, se midieron el peso corporal y el volumen tumoral dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó del siguiente modo: volumen tumoral (mm³) = $0.5 \times \text{diámetro largo del tumor} \times \text{diámetro corto del tumor}^2$. Los datos se analizaron utilizando una prueba de la *t*.

Los efectos antitumorales *in vivo* de PR006292 y PR004549 se muestran en la FIG. 15(c). Específicamente, el volumen tumoral medio del grupo de ratones de control tratado con Iso hlgG1 el día 36 después de la incubación era de 847 mm³. El volumen tumoral medio del

grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006292 (0.2 mg/kg) el día 36 después de la inoculación era de 131 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0076$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 84.53%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006292 (0.04 mg/kg) el día 36 después de la inoculación era de 505 mm³, lo cual no muestra ninguna diferencia significativa (valor de $p = 0.3856$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 40.36%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.2 mg/kg) el día 36 después de la inoculación era de 858 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p > 0.9999$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del -1.28%. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR004549 (0.04 mg/kg) el día 36 después de la inoculación era de 844 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p > 0.9999$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 0.39%. Durante todo el tratamiento, los animales mostraron una buena tolerancia a los fármacos, sin que se produjera una gran pérdida de peso ni el fallecimiento de los animales.

Modelo de tumor HuP-T4 PBMC

Los estudios de la farmacodinámica *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratones NCG para recrear el modelo de tumor HuP-T4 del sistema inmunitario de PBMC humanas. El método es específicamente como se indica a continuación. El día de la inoculación de las células, cada ratón NCG se inoculó por vía subcutánea con células tumorales HuP-T4. Cuando el volumen tumoral medio de cada grupo de ratones alcanzó 130 mm³, los ratones se dividieron en grupos y se realizaron un total de cuatro administraciones a través de las venas de las colas. Tras el comienzo de la administración, se midieron el peso corporal y el volumen tumoral dos veces por semana. El volumen tumoral se calculó del siguiente modo: volumen tumoral (mm³) = $0.5 \times \text{diámetro largo del tumor} \times \text{diámetro corto del tumor}^2$. Los datos se analizaron utilizando una prueba de la t .

El efecto antitumoral *in vivo* de PR006292 se muestra en la FIG. 15(d). Específicamente, el volumen tumoral medio del grupo de ratones de control tratado con Iso hlgG1 el día 36 después de la incubación era de 1059 mm³. El volumen tumoral medio del grupo de tratamiento con el fármaco de estudio PR006292 (0.5 mg/kg) el día 36 después de la inoculación era de 129 mm³, lo cual muestra una diferencia significativa (valor de $p = 0.0022$) respecto al del grupo de control tratado con Iso hlgG1, siendo la tasa de inhibición del crecimiento tumoral TGI (%) del 87.75%. Durante todo el tratamiento, los animales mostraron una buena tolerancia a los fármacos, sin que se produjera una gran pérdida de peso ni el fallecimiento de los animales.

Prueba de liberación de citocinas in vivo en ratones

Los estudios de la hipercitocinemia *in vivo* se llevaron a cabo utilizando ratones NCG para recrear el sistema inmunitario de PBMC humanas. El método es específicamente como se indica a continuación. A cada ratón NCG se le inyectaron por vía intravenosa 2×10^7 PBMC humanas, y al día siguiente, se le administraron por vía intravenosa los anticuerpos PR006292, PR004549 e IgG1 de control. Se extrajo sangre para recoger suero a 0 h (antes de la administración), 4 y 24 h después de la administración. El método MSD se utilizó para detectar los niveles de una pluralidad de citocinas en el suero, que incluían IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 y TNF- α . Los datos se analizaron utilizando una prueba de la *t*.

La FIG. 15(e) muestra la expresión de una parte de las citocinas que eran detectables en el suero murino 4 h después de la inyección de los anticuerpos. Los resultados mostraron que PR006292 inducía una liberación menor de las citocinas tales como IFN- γ , IL-2 y TNF- α en comparación con el anticuerpo de control PR004549, lo cual indica una mejor seguridad.