

TERAPIA DE COMBINACIÓN QUE IMPLICA AGENTES DE UNIÓN BIESPECÍFICOS QUE SE UNEN A CLDN18.2 Y CD3 Y AGENTES QUE ESTABILIZAN O AUMENTAN LA EXPRESIÓN DE CLDN18.2

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y se espera que sea responsable de unos 9,6 millones de muertes en 2018 (Bray, F. et al., CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68: 394–424, 2018). En general, una vez que un tumor sólido ha hecho metástasis, con algunas excepciones tales como los tumores de células germinales y algunos carcinoides, la supervivencia a 5 años rara vez supera el 25 %. El mal pronóstico de ciertos cánceres pone de manifiesto la necesidad de enfoques terapéuticos adicionales

La molécula de unión estrecha claudina 18 (CLDN18) es una proteína transmembrana integral (tetraspanina) que tiene cuatro regiones hidrofóbicas que abarcan la membrana y dos bucles extracelulares (bucle1 abarcado por la región hidrofóbica 1 y la región hidrofóbica 2; bucle2 abarcado por las regiones hidrofóbicas 3 y 4). CLDN18 existe en dos variantes de empalme diferentes, descritas en ratón y ser humano (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380–90, 2001). Las variantes de empalme (número de acceso Genbank: variante de empalme 1 (CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, y variante de empalme 2 (CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026) tienen un peso molecular de aproximadamente 27,9 / 27,72 kD. Las variantes de empalme CLDN18.1 y CLDN18.2 difieren en la porción N-terminal que comprende la primera región transmembrana (TM) y el bucle1, mientras que la secuencia de proteína primaria del C-terminal es idéntica.

En los tejidos normales, no hay expresión detectable de CLDN18.2, a excepción del estómago, donde CLDN18.2 se expresa exclusivamente en células epiteliales gástricas diferenciadas de vida corta. CLDN18.2 se mantiene en el curso de la transformación maligna y, por tanto, se muestra con frecuencia en la superficie de las células de cáncer gástrico humano. Además, este antígeno pan-tumoral se activa ectópicamente a niveles significativos en adenocarcinomas de esófago, páncreas y pulmón. La proteína CLDN18.2 también se localiza en metástasis de ganglios linfáticos de adenocarcinomas de cáncer gástrico y en metástasis a distancia, especialmente en el ovario (los llamados tumores de Krukenberg).

La expresión diferencial de claudinas tales como CLDN18.2 entre las células

cancerosas y las normales, su localización en la membrana y su ausencia en la gran mayoría de los tejidos normales relevantes desde el punto de vista de la toxicidad hacen que estas moléculas sean dianas atractivas para la inmunoterapia del cáncer, y el uso de terapias basadas en anticuerpos para dirigirse a CLDN18.2 en la terapia del cáncer promete un alto nivel de especificidad terapéutica.

Ganymed Pharmaceuticals AG ha desarrollado el anticuerpo quimérico IgG1 IMAB362 (Zolbetuximab (anteriormente denominado Claudiximab)) dirigido contra CLDN18.2. IMAB362 reconoce el primer dominio extracelular (ECD1) de CLDN18.2 con alta afinidad y especificidad. IMAB362 no se une a ningún otro miembro de la familia de la claudina, que incluye la variante de empalme 1 de la Claudina 18 (CLDN18.1), estrechamente relacionada. IMAB362 muestra una especificidad celular tumoral precisa y agrupa dos mecanismos de acción independientes altamente potentes. Después de la unión a la diana, IMAB362 media la muerte celular principalmente por ADCC y CDC. En consecuencia, IMAB362 lisa eficazmente células CLDN18.2-positivas, que incluyen líneas celulares de cáncer gástrico humano *in vitro* e *in vivo*. Se demostró la eficacia antitumoral de IMAB362 en ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares de cáncer CLDN18.2-positivas.

Los anticuerpos IgG1 normalmente intervienen en el sistema inmunitario celular mediante la interacción del dominio Fc con los receptores Fcγ (FcγR) expresados en varias células inmunitarias, que incluyen las células citolíticas naturales, que son los principales agentes de la ADCC. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales IgG1 (mAbs) que desencadenan la ADCC se enfrentan a varias limitaciones, que incluyen la amplia distribución de variantes de receptores Fc de baja afinidad en la población (hasta el 80 %), así como las modificaciones *in vivo* de IgG1 que reducen la eficacia de los mAbs (Chames et al., (2009) Br J Pharmacol, 157(2):220–233). Los anticuerpos terapéuticos también tienen que competir con las IgG de los pacientes, lo que producen dosis altas mAbs *in vivo*. Además, los anticuerpos terapéuticos pueden interactuar con el FcγRIIb (un FcγR inhibidor expresado por las células B, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) lo que produce una señalización negativa que disminuye su eficacia.

Un objeto de la invención ha sido proporcionar terapias novedosas para enfermedades cancerosas.

La presente invención abarca en general el tratamiento de un sujeto que comprende la administración de un agente de unión biespecífico descrito en la presente que comprende dos dominios de unión CLDN18.2 en el formato Fab que son específicos para células cancerosas, y un dominio de unión CD3 en el formato scFv que es específico para el antígeno CD3 específico de células T que permite unirse a células T y atraer a las células T hacia el complejo, de este modo permite dirigir el efecto citotóxico de las células T a las células cancerosas. La formación de este complejo puede inducir la señalización en las células T citotóxicas, ya sea por sí sola o en combinación con células accesorias, lo que lleva a la liberación de mediadores citotóxicos. El tratamiento mediante un agente de unión biespecífico descrito en la presente se combina con un tratamiento adicional que comprende la administración de uno o más agentes que estabilizan o aumentan la expresión de CLDN18.2

En la presente se demuestra que un tratamiento que incluye un agente de unión biespecífico descrito en la presente y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede inducir un potente efecto antitumoral.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención en general proporciona una terapia de combinación que incluye un agente de unión biespecífico que se une a CLDN18.2 y CD3 y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico es un agente de unión tetramérico biespecífico. En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende gemcitabina, paclitaxel, o una combinación de los mismos.

La invención proporciona una composición o preparación medicinal que comprende:

(a) un agente de unión biespecífico que comprende un primer dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, un segundo dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, y un tercer dominio de unión que se une a CD3 humano,

en donde el agente de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde

(i) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

5 (ii) la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

10 (iv) la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(b) un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2.

15 En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

20 En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

25 En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades,

(i) la primera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

5 (ii) la segunda cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de
10 secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

15 La invención además proporciona una composición o preparación medicinal que comprende:

(a) un agente de unión biespecífico que comprende un primer dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, un segundo dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, y un tercer dominio de unión que se une a CD3 humano,

en donde el agente de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde

20 (i) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

(ii) la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

5 (b) un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28.

10 En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades,

15 (i) la primera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

(ii) la segunda cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID NO: 29.

La invención además proporciona una composición o preparación medicinal que comprende:

5 (a) un agente de unión biespecífico que comprende un primer dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, un segundo dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana, y un tercer dominio de unión que se une a CD3 humano, en donde el agente de unión está codificado por una o más moléculas de ácido nucleico que comprende:

(i) una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

10 (ii) una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28; y

(iii) una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una tercera cadena polipeptídica que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(b) un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2.

15 En algunas modalidades, la una o más moléculas de ácido nucleico es un conjunto de ácidos nucleicos.

En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde

20 (i) la primera cadena polipeptídica está codificada por la primera secuencia de ácidos nucleicos;

(ii) la segunda cadena polipeptídica está codificada por la segunda secuencia de ácidos nucleicos;

(iii) la tercera cadena polipeptídica está codificada por la tercera secuencia de ácidos nucleicos; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica está codificada por la tercera secuencia de ácidos nucleicos.

5 En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 27 comprende una supresión de lisina en la posición 447 de la SEQ ID NO: 27.

10 En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 28 comprende una supresión de lisina en la posición 720 de la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

15 En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades,

20 (i) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 27 comprende una supresión de lisina en la posición 447 de la SEQ ID NO: 27;

25 (ii) la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 28 comprende una supresión de lisina en la posición 720 de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

5 En algunas modalidades,

(i) la primera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 27 comprende una supresión de lisina en la posición 447 de la SEQ ID NO: 27;

10 (ii) la segunda cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o una variante de truncamiento C-terminal de la misma, en donde la variante de truncamiento C-terminal de la SEQ ID NO: 28 comprende una supresión de lisina en la posición 720 de la SEQ ID NO: 28;

15 (iii) la tercera cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

(iv) la cuarta cadena polipeptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica interactúa con la segunda cadena polipeptídica y con la tercera cadena polipeptídica.

20 En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica interactúa con la cuarta cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica interactúa con la segunda cadena polipeptídica y con la tercera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica interactúa con la cuarta cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende, desde el extremo N-terminal al C-terminal,

(i) una región variable de una cadena pesada (VH) derivada de una inmunoglobulina que se une a CLDN18.2 humana (VH(CLDN18.2)),

5 (ii) una región constante 1 de una cadena pesada (CH1) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma,

(iii) una región constante 2 de una cadena pesada (CH2) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma, y

10 (iv) una región constante 3 de una cadena pesada (CH3) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende, desde el extremo N-terminal al C-terminal,

(i) una región variable de una cadena pesada (VH) derivada de una inmunoglobulina que se une a CLDN18.2 humana (VH(CLDN18.2)),

15 (ii) una región constante 1 de una cadena pesada (CH1) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma,

(iii) una región variable de una cadena ligera (VL) derivada de una inmunoglobulina que se une a CD3 humano (VL(CD3)),

20 (iv) una región variable de una cadena pesada (VH) derivada de una inmunoglobulina que se une a CD3 humano (VH(CD3)),

(v) una región constante 2 de una cadena pesada (CH2) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma, y

(vi) una región constante 3 de una cadena pesada (CH3) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica comprende, desde el extremo N-terminal al C-terminal,

5 (i) una región variable de una cadena ligera (VL) derivada de una inmunoglobulina que se une a CLDN18.2 humana (VL(CLDN18.2)), y

(ii) una región constante de una cadena ligera (CL) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma.

10 En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica comprende, desde el extremo N-terminal al C-terminal,

(i) una región variable de una cadena ligera (VL) derivada de una inmunoglobulina que se une a CLDN18.2 humana (VL(CLDN18.2)), y

(ii) una región constante de una cadena ligera (CL) derivada de una inmunoglobulina o una variante funcional de la misma.

15 En algunas modalidades, la VH(CLDN18.2) de la primera cadena polipeptídica y la VL(CLDN18.2) de la tercera cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana.

20 En algunas modalidades, la VH(CLDN18.2) de la segunda cadena polipeptídica y la VL(CLDN18.2) de la cuarta cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión que se une a CLDN18.2 humana.

En algunas modalidades, la VH(CD3) y la VL(CD3) interactúan para formar un dominio de unión que se une a CD3 humano.

En algunas modalidades, la VH(CLDN18.2) comprende una CDR1 que comprende la

secuencia de aminoácidos SYWIN (SEQ ID NO: 10), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos NIYPSDSYTNYNQKFQG (SEQ ID NO: 11), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos SWRGNSFDY (SEQ ID NO: 12).

5 En algunas modalidades, la VL(CLDN18.2) comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos KSSQSLLNSGNQKNILT (SEQ ID NO: 13), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRES (SEQ ID NO: 14), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QNDYSYPFT (SEQ ID NO: 15).

10 En algunas modalidades, la VH(CD3) comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos TYAMN (SEQ ID NO: 18), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RIRSKANNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 23), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 19).

15 En algunas modalidades, la VL(CD3) comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 20), una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTNKRAP (SEQ ID NO: 21), y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 22).

En algunas modalidades, la CH2 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CH2 de la segunda cadena polipeptídica y/o la CH3 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CH3 de la segunda cadena polipeptídica.

20 En algunas modalidades, la CH1 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CL de la tercera cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, la CH1 de la segunda cadena polipeptídica interactúa con la CL de la cuarta cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, la inmunoglobulina es IgG1. En algunas modalidades, la IgG1 es IgG1 humana.

25 En algunas modalidades, la VH(CLDN18.2) comprende o consiste en la secuencia de

aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, la VL(CLDN18.2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la VL(CD3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, la VH(CD3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades,

la VH(CLDN18.2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16,

la VL(CLDN18.2) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17,

la VH(CD3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25, y

la VL(CD3) comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, la VH(CLDN18.2), VL(CLDN18.2), VH(CD3) y/o VL(CD3) están humanizadas.

En algunas modalidades, de la primera cadena polipeptídica la CH1 está conectada a la CH2 mediante un ligador peptídico L1. En algunas modalidades, el ligador peptídico L1 comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 6) o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la VL(CD3) está conectada a la CH1 mediante un ligador peptídico L2. En algunas modalidades, el ligador peptídico L2 comprende la secuencia de aminoácidos $(G_4S)_x$ o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas modalidades, el ligador peptídico L2 comprende la secuencia de aminoácidos $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 5) o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la VL(CD3) y la VH(CD3) están conectadas entre sí mediante un ligador peptídico L3. En algunas modalidades, el ligador peptídico L3 comprende la secuencia de aminoácidos $(GKPGS)_x$ o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas modalidades, el ligador peptídico L3 comprende la secuencia de aminoácidos $(GKPGS)_4$ (SEQ ID NO: 2) o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la VH(CD3) está conectada a la CH2 mediante un ligador peptídico L4. En algunas modalidades, el ligador peptídico L4 comprende la secuencia de aminoácidos $(G_4S)_x$ o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6. En algunas modalidades, el ligador peptídico L4 comprende la secuencia de aminoácidos $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 5) o una variante funcional de la misma.

En ciertas modalidades, los dominios CH1, CH2 y/o CH3 del agente de unión biespecífico descritos en la presente comprenden una o más modificaciones de aminoácidos, en particular sustituciones y/o supresiones, en posiciones correspondientes a las posiciones de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, la CH1 de la primera y/o la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de ácido aspártico en la posición 208 de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, la CH1 de la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de ácido aspártico en la posición 208 de acuerdo con la numeración EU y la CH1 de la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de asparagina en la posición 208 de acuerdo con la numeración EU.

Además, En ciertas modalidades, el agente de unión descrito en la presente no se une sustancialmente, por ejemplo, no detectablemente, a FcγRI, IIa, IIb, y/o IIIa humanos. En algunas modalidades, la CH2 de la primera y/o la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más de los siguientes: un residuo de

prolina en la posición 233, un residuo de valina en la posición 234, un residuo de alanina en la posición 235, una supresión en la posición 236, un residuo de lisina en la posición 267 y un residuo de ácido glutámico en la posición 295 de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, las CH2 de la primera y la segunda cadena polipeptídica comprenden una

5 secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de prolina en la posición 233, un residuo de valina en la posición 234, un residuo de alanina en la posición 235, una supresión en la posición 236 y un residuo de lisina en la posición 267 de acuerdo con la numeración EU y en donde la CH2 de la primera cadena polipeptídica además comprende un residuo de ácido glutámico en la posición 295 de acuerdo con la numeración EU y la CH2 de la segunda cadena

10 polipeptídica además comprende un residuo de glutamina en la posición 295 de acuerdo con la numeración EU.

En algunas modalidades, la CH3 de la primera y/o la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más de los siguientes: a residuo de glutamina en la posición 357, un residuo de lisina en la posición 364, un residuo

15 de ácido aspártico en la posición 368, un residuo de serina en la posición 370, un residuo de ácido aspártico en la posición 384, un residuo de ácido glutámico en la posición 418 y un residuo de ácido aspártico en la posición 421 de acuerdo con la numeración EU. En algunas modalidades, la CH3 de la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de ácido glutámico en la posición 357, un residuo de

20 serina en la posición 364, un residuo de ácido aspártico en la posición 368, un residuo de serina en la posición 370, un residuo de ácido aspártico en la posición 384, un residuo de ácido glutámico en la posición 418 y un residuo de ácido aspártico en la posición 421 de acuerdo con la numeración EU y la CH3 de la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos que comprende un residuo de glutamina en la posición 357, un

25 residuo de lisina en la posición 364, un residuo de leucina en la posición 368, un residuo de lisina en la posición 370, un residuo de asparagina en la posición 384, a residuo de glutamina en la posición 418 y un residuo de asparagina en la posición 421 de acuerdo con la numeración EU.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de

30 aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de

aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8.

En algunas modalidades, la tercera y/o cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, la CD3 se expresa en la superficie de las células T. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico descrito en la presente se une a la cadena épsilon de CD3. En algunas modalidades, la unión del agente de unión a CD3 en células T produce la proliferación y/o activación de las células T. En algunas modalidades, la proliferación y/o activación de células T incluye proliferación y/o activación de células T CD4 y/o CD8, con preferencia células T CD107a+. En algunas modalidades, dichas células T proliferadas y/o activadas son capaces de degranulación. En algunas modalidades, dichas células T activadas liberan factores citotóxicos, por ejemplo, perforinas y granzimas, e inician la citólisis y/o apoptosis de las células cancerosas.

En algunas modalidades, CLDN18.2 se expresa en células cancerosas. En algunas modalidades, CLDN18.2 se expresa en la superficie de las células cancerosas. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico se une a una porción extracelular de CLDN18.2. En algunas modalidades, el agente de unión induce citotoxicidad mediada por células T contra las células cancerosas que expresan CLDN18.2.

En algunas modalidades, las células cancerosas provienen de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, particularmente adenocarcinoma gástrico, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica (GEJ), particularmente adenocarcinoma GEJ, cáncer pancreático, particularmente adenocarcinoma pancreático, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza-cuello, cáncer de vías biliares, cáncer de vesícula biliar y sus metástasis, un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de los ganglios linfáticos.

En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico comprende una o más modificaciones postraduccionales. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico se deriva de una o más modificaciones postraduccionales de un agente de unión descrito en la presente. En algunas modalidades, la una o más modificaciones postraduccionales se

seleccionan de piroglutamilación en el extremo N-terminal de una o más VH(CLDN18.2), supresión de lisina en el extremo C-terminal de la primera cadena polipeptídica y supresión de lisina en el extremo C-terminal de la segunda cadena polipeptídica.

5 En algunas modalidades, un agente de unión biespecífico se proporciona como ácido nucleico que codifica el agente de unión. En algunas modalidades, un agente de unión biespecífico se proporciona como un conjunto de ácidos nucleicos juntos que codifican el agente de unión. En algunas modalidades, el ácido nucleico o el conjunto de ácidos nucleicos es capaz de expresar el agente de unión biespecífico.

10 En algunas modalidades, un vector comprende el ácido nucleico o el conjunto de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, un conjunto de vectores comprende el conjunto de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, cada ácido nucleico del conjunto de ácidos nucleicos está contenido en un vector del conjunto de vectores. En algunas modalidades, el vector o el conjunto de vectores es capaz de expresar el agente de unión biespecífico.

15 La expresión del ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos, o del vector o conjunto de vectores, por ejemplo, en un sujeto, puede proporcionar el agente de unión biespecífico.

20 En algunas modalidades, un ácido nucleico está unido de forma operable a cualquier número de elementos reguladores (promotores, origen de replicación, marcadores seleccionables, sitios de unión ribosómica, inductores, etc.). El vector puede ser un vector de expresión y puede ser un vector extracromosómico o integrador. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos que codifican una cadena polipeptídica del agente de unión descrito en la presente están contenidos cada uno en un vector de expresión único. Los ácidos nucleicos pueden estar bajo el control de diferentes o los mismos promotores. En estas modalidades, se pueden utilizar diferentes relaciones de vectores para impulsar la formación del agente de unión descrito en la presente.

25 En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un agente quimioterapéutico.

En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un agente citotóxico y/o citostático.

En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en antraciclinas, análogos de nucleósido, compuestos de platino, análogos de camptotecina y taxanos, profármacos de los mismos, sales de los mismos, y combinaciones de los mismos.

- 5 En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un análogo de nucleósido, un profármaco del mismo, o una sal del mismo.

En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende un taxano, un profármaco del mismo, o una sal del mismo.

- 10 En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 comprende (i) gemcitabina, un profármaco del mismo, o una sal del mismo, (ii) paclitaxel, un profármaco del mismo, o una sal del mismo, o (iii) una combinación de gemcitabina, un profármaco del mismo, o una sal del mismo, y paclitaxel, un profármaco del mismo, o una sal del mismo.

- 15 En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal comprende:

(i) el agente de unión biespecífico;

(ii) oxaliplatino;

(iii) fluorouracilo o un precursor del mismo; y opcionalmente

(iv) ácido folínico.

- 20 En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal además comprende pembrolizumab o irinotecano.

En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal comprende:

(i) el agente de unión biespecífico;

(ii) paclitaxel; y

(iii) ramucirumab.

5 En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal es una composición farmacéutica. En algunas modalidades, la composición farmacéutica además comprende uno o más portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal es un kit. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico y el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 están en viales separados.

10 En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal además comprende instrucciones para el uso del agente de unión biespecífico y el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 para tratar o prevenir el cáncer.

La invención además proporciona la composición o preparación medicinal descrita en la presente para uso farmacéutico.

15 En algunas modalidades, el uso farmacéutico comprende un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno.

En algunas modalidades, el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o trastorno comprende tratar o prevenir el cáncer.

20 En algunas modalidades, el cáncer incluye las células cancerosas que expresan CLDN18.2.

En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, particularmente adenocarcinoma gástrico, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica (GEJ), particularmente adenocarcinoma GEJ, cáncer pancreático,

particularmente adenocarcinoma pancreático, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza–cuello, cáncer de vías biliares, cáncer de vesícula biliar y sus metástasis, un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o
5 metástasis de los ganglios linfáticos.

En algunas modalidades, la composición o preparación medicinal descrita en la presente es para la administración a un ser humano.

La invención además proporciona un método de tratamiento o prevención de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto:

10 (a) un agente de unión biespecífico descrito en la presente; y

(b) un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2.

En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico es un agente de unión biespecífico descrito en el contexto de la composición o preparación medicinal descrita en la presente. En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de
15 CLDN18.2 es un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 descrito en la presente, por ejemplo, como se describe en el contexto de la composición o preparación medicinal descrita en la presente.

En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

La invención además proporciona la composición o preparación medicinal descrita en
20 la presente para usar en el método descrito en la presente.

De acuerdo con la invención, CLDN18.2 con preferencia tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica no comprende una VL(CLDN18.2). En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica no comprende una

VL(CLDN18.2). En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica no comprende a VH(CLDN18.2). En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica no comprende a VH(CLDN18.2).

5 En algunas modalidades, los dominios de unión de CLDN18.2 del agente de unión biespecífico están en el formato de fragmento Fab. En algunas modalidades, el dominio de unión CD3 del agente de unión biespecífico está en el formato de un resto sconsultar

10 En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico no se une a CLDN18.1. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico no se une a CLDN18.1 del ser humano, ratón o cynomolgus. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico no se une a CLDN9, tal como CLDN9 humano.

En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico se une a CLDN18.2 de más de una especie tal como CLDN18.2 del ser humano, ratón o cynomolgus.

15 En algunas modalidades, el tratamiento de un sujeto, tal como un paciente, con el agente de unión biespecífico y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, como se describe en la presente, produce una supervivencia prolongada de dicho sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento de un paciente con el agente de unión biespecífico y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 como se describe en la presente reduce, con preferencia de forma significativa, el crecimiento y/o el volumen de un tumor de un sujeto tal como un paciente.

20 En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico descrito en la presente es capaz de redirigir las células T para atacar las células cancerosas y, por lo tanto, actúa a través de la citotoxicidad de células T redirigida (RTCC). En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico no es capaz, o no es sustancialmente capaz, de inducir ADCC. En algunas modalidades, el agente de unión no es capaz, o no es sustancialmente capaz, de inducir CDC

25

En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico se produce mediante un método que comprende transfectar células huésped con un ácido nucleico, un conjunto de ácidos nucleicos, un vector o un conjunto de vectores que codifican las cadenas polipeptídicas

del agente de unión biespecífico. En algunas modalidades, las células huésped expresan el ácido nucleico, el conjunto de ácidos nucleicos, el vector o el conjunto de vectores. En algunas modalidades, una célula huésped coexpresa un ácido nucleico que codifica la primera cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico, un ácido nucleico que codifica la segunda
5 cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico, un ácido nucleico que codifica la tercera cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico y un ácido nucleico que codifica la cuarta cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico. En algunas modalidades, dichos ácidos nucleicos están contenidos en un vector o en un conjunto de vectores. En algunas modalidades, una célula huésped expresa todas las cadenas polipeptídicas del
10 agente de unión biespecífico. En algunas modalidades, la célula huésped, después de la transfección, produce el agente de unión biespecífico, con preferencia cuando se cultiva en condiciones apropiadas para la producción del agente de unión, como las descritas en la presente o conocidas en la técnica. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico se puede obtener a partir de la célula huésped.

15 En consecuencia, en algunas modalidades, un método para producir el agente de unión biespecífico comprende las etapas de transfección de una célula huésped con un ácido nucleico que codifica la primera cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico, un ácido nucleico que codifica la segunda cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico, un ácido nucleico que codifica la tercera cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico,
20 y un ácido nucleico que codifica la cuarta cadena polipeptídica del agente de unión biespecífico, que expresa dichos ácidos nucleicos en la célula huésped y la obtención del agente de unión biespecífico. En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de mamífero, con preferencia seleccionada del grupo que consiste en células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, células HEK293, células T HEK293 y similares. En algunas
25 modalidades, la célula huésped es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula de insecto. En algunas modalidades, el agente de unión se produce *in vitro*. En algunas modalidades, el agente de unión se produce *in vivo*, por ejemplo, en un sujeto para tratar, tal como un sujeto que tiene una enfermedad, en particular una enfermedad asociada con células que expresan CLDN18.2, por ejemplo, cáncer. En
30 algunas modalidades, las diferentes cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico se producen en dos o más células huésped diferentes. En algunas modalidades, todas las cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico se producen en la misma célula huésped.

En algunas modalidades, las cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico están unidas entre sí, por ejemplo, unidas covalentemente. En algunas modalidades, las cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico se producen como un polipéptido que comprende todas las cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico. En algunas modalidades, al menos dos cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico están unidas entre sí y se producen como un polipéptido. En algunas modalidades, las cadenas polipeptídicas del agente de unión biespecífico descrito en la presente se producen por separado, es decir, como polipéptidos separados, por ejemplo, en la misma célula o en células diferentes e interactúan durante o después de la producción para formar el agente de unión biespecífico, por ejemplo, dentro de una célula o fuera de una célula. En algunas modalidades, las cadenas polipeptídicas se producen como polipéptidos separados, es decir, la primera cadena polipeptídica se produce como un polipéptido, la segunda cadena polipeptídica se produce como un polipéptido, la tercera cadena polipeptídica se produce como un polipéptido, y la cuarta cadena polipeptídica se produce como un polipéptido, y las cadenas polipeptídicas interactúan para formar el agente de unión biespecífico.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 representa el formato “Fab2–scFv” del agente de unión biespecífico descrito en la presente que comprende una VH fusionado recombinantemente a un lado de un Fc heterodimérico (la primera cadena polipeptídica descrita en la presente), una VH fusionado recombinantemente a un scFv fusionado al otro lado del Fc heterodimérico (la segunda cadena polipeptídica descrita en la presente), y una LC (tercera y cuarta cadenas polipeptídicas descritas en la presente) que forman dominios Fab con la VH de la primera cadena polipeptídica y la VH adicional de la segunda cadena polipeptídica..

Figura 2: Expresión de Claudina18.2 en células de carcinoma pancreático con o sin tratamiento con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (Primer experimento)

Los histogramas muestran la expresión de claudina18.2 en la superficie de MIA PaCa–2_GFP_CLDN18.2_27.

Abierto: tratado con 0,1 µg/ml de gemcitabina y 0,003 µg/ml de paclitaxel durante 2 días, Relleno: no tratado.

Figura 3: Citotoxicidad de ASP2138 en cocultivo de PBMC y células de carcinoma pancreático con o sin tratamiento con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (Primer experimento)

Las células MIA PaCa-2 tratadas con o sin clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel se cocultivaron con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en una relación de células efectoras a células diana de 10 : 1 y ASP2138 (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/ml) durante 1 día. El número de células diana vivas se midió mediante citometría de flujo y se calculó la citotoxicidad (%). Cada punto de datos representa la media de duplicados en un experimento único. Los puntos de datos tratados con clorhidrato de gemcitabina, paclitaxel y 1 ng/ml o 30 ng/ml de ASP2138 se realizaron en singlete. Cada línea representa la curva de regresión no lineal ajustada. MIA PaCa-2: MIA PaCa-2_GFP_CLDN18.2_27, Quimioterapia: tratamiento con 0,1 µg/ml de gemcitabina y 0,003 µg/ml de paclitaxel durante 2 días.

Figura 4: Expresión de Claudina18.2 en células de carcinoma pancreático con o sin tratamiento con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (Segundo experimento)

Los histogramas muestran la expresión de claudina18.2 en la superficie de MIA PaCa-2_GFP_CLDN18.2_27.

Abierto: tratado con 0,1 µg/ml de gemcitabina y 0,003 µg/ml de paclitaxel durante 2 días, Relleno: no tratado.

Figura 5: Citotoxicidad de ASP2138 en cocultivo de PBMC y Células de carcinoma pancreático con o sin tratamiento con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (Segundo experimento)

Las células MIA PaCa-2 tratadas con o sin clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel se cocultivaron con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en una relación de células efectoras a células diana de 10:1 y ASP2138 (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng/ml) durante 1 día. El número de células diana vivas se midió mediante citometría de flujo y se calculó la citotoxicidad (%). Cada punto de datos representa

la media de duplicados en un experimento único. Cada línea representa la curva de regresión no lineal ajustada.

MIA PaCa-2: MIA PaCa-2_GFP_CLDN18.2_27, Quimioterapia: tratamiento con 0,1 µg/ml de gemcitabina y 0,003 µg/ml de paclitaxel durante 2 días.

5 **Figura 6: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel en un modelo de ratón knock-in CD3ε humano portador del tumor B16-F10 que expresa CLDN18.2 en ratones**

Se inocularon células B16F10_mCLDN18.2 por vía subcutánea en el flanco de ratones a razón de $2,0 \times 10^5$ células en el día -4. Los ratones hCD3ε KI recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,01 mg/kg) y paclitaxel (10 mg/kg) en los días 0 y 7, y clorhidrato de gemcitabina (40 mg/kg) en los días 0, 3, 7 y 10. Parte superior: los volúmenes tumorales de cada grupo se representan en cada punto de tiempo como la media $\pm$ SEM (n=15). Parte inferior: los gráficos de dispersión indican el volumen tumoral individual en el día 14 y las líneas horizontales cortas y las barras de error representan la media $\pm$ SEM (n=15). El análisis estadístico se realizó con los valores del día 14.

** $P < 0,01$ en comparación con el valor del grupo de combinación en el día 14 (prueba t de Student no apareada).

B16F10_mCLDN18.2: B16-F10 que expresa claudina 18.2 de ratón; hCD3ε KI: CD3ε humano knock-in; Quimioterapia: clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel

20 **Figura 7: Cambios en el peso corporal de un ratón CD3ε Knock-in humano portador de un tumor B16-F10 que expresa CLDN18.2 de ratón tratado con ASP2138 y/o quimioterapia**

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,01 mg/kg) y paclitaxel (10 mg/kg) los días 0 y 7, y clorhidrato de gemcitabina (40 mg/kg) los días 0, 3, 7 y 10. Cada punto representa la media $\pm$ SEM (0,01 mg/kg)

CLDN18.2: claudina 18.2; Quimioterapia: clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel

Figura 8: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con FOLFOX en un modelo de ratón CD3ε Knock-in humano portador de un tumor MC38 que expresa CLDN18.2 humana

5 Se inocularon células MC38_hCLDN18.2 por vía subcutánea en el flanco de ratones a razón de $2,0 \times 10^5$ células en el día -6. Los ratones hCD3ε KI recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg) y oxaliplatino (2,5 mg/kg) en los días 0, 4, 7 y 11. Parte superior: los volúmenes tumorales de cada grupo se representan en cada punto de tiempo como la media $\pm$ SEM (n=15). Parte
10 inferior: los gráficos de dispersión indican el volumen tumoral individual en el día 14 y las líneas horizontales cortas y las barras de error representan la media $\pm$ SEM (n=15). El análisis estadístico se realizó con los valores del día 14

** $\cdot$ P<0,01 en comparación con el valor del grupo de combinación en el día 14 (Prueba t de Student).

15 MC38_hCLDN18.2: MC38 que expresa claudina 18.2 humana; hCD3ε KI: CD3ε knock-in humano; FOLFOX: 5-fluorouracilo y oxaliplatino

Figura 9: Cambios en el peso corporal en un ratón CD3ε knock-in humano portador del tumor MC38 que expresa CLDN18.2 humana tratado con ASP2138 y/o FOLFOX

20 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg) y oxaliplatino (2,5 mg/kg) en los días 0, 4, 7 y 11. Cada punto de datos representa la media $\pm$ SEM (n=15).

CLDN18.2: claudina 18.2; FOLFOX: 5-fluorouracilo y oxaliplatino

25 **Figura 10: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con FOLFIRINOX en un modelo de modelo de ratón CD3ε knock-in humano portador del tumor MC38 que**

expresa CLDN18.2 humana

Las células MC38_hCLDN18.2 se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones a razón de $2,0 \times 10^5$ células en el día -6. hCD3ε KI Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg), oxaliplatino (2,5 mg/kg) y clorhidrato de irinotecano (10 mg/kg) en los días 0, 4 y 7.

Parte superior: los volúmenes tumorales de cada grupo se representan en cada punto de tiempo como la media $\pm$ SEM (n=15). Parte inferior: los gráficos de dispersión indican el volumen tumoral individual en el día 14 y las líneas horizontales cortas y las barras de error representan la media $\pm$ SEM (n=15). El análisis estadístico se realizó con los valores del día 11.

** $P < 0,01$ en comparación con el valor del grupo de combinación en el día 11 (Prueba t de Student).

MC38_hCLDN18.2: MC38 que expresa claudina 18.2 humana; hCD3ε KI: CD3ε knock-in humano; FOLFIRINOX: 5-fluorouracilo, oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano

Figura 11: Cambios en el peso corporal en un ratón CD3ε knock-in humano portador del tumor MC38 que expresa CLDN18.2 humana tratado con ASP2138 y/o FOLFIRINOX

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg), oxaliplatino (2,5 mg/kg) y clorhidrato de irinotecano (10 mg/kg) en los días 0, 4 y 7. Cada punto de datos representa la media $\pm$ SEM (n=15).

CLDN18.2: claudina 18.2; FOLFIRINOX: 5-fluorouracilo, oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aunque la presente invención se describe en detalle a continuación, se debe entender que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente, ya que pueden variar. También se debe entender que la terminología empleada en la presente tiene por objeto describir únicamente modalidades particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica.

A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos descritos y las modalidades preferidas no se deben interpretar como una limitación de la presente invención a las modalidades descritas explícitamente. Esta descripción se debe entender que apoya y abarca modalidades que combinan las modalidades explícitamente descritas con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud se debe considerar divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

Con preferencia, los términos utilizados en la presente se definen como se describe en “A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

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

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprende”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implican la inclusión de un miembro, número

entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas declarados, pero no la exclusión de cualquier otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas, aunque En algunas modalidades, dicho otro miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas se puede excluir, es decir, que el

5 objeto consiste en la inclusión de un miembro, número entero o etapa o grupo de miembros, números enteros o etapas declarados. Se contempla como una modalidad específica de la presente descripción que el término “que comprende” abarca la posibilidad de que no haya otros miembros presentes, es decir, a los efectos de esta modalidad, “que comprende” se debe entender en el sentido de “que consiste en” o “que consiste esencialmente en”.

10 Los términos “un” y “una” y “el/la” y referencias similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) se deben interpretar tanto en singular como en plural, a menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente por el contexto.

15 La recitación de intervalos de valores en la presente solo pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario, cada valor individual se incorpora a la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente.

Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente.

20 El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, “tal como”), que se proporcionan en la presente pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ninguna frase de la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativo de ningún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

25 El término “aproximadamente” significa aproximadamente o casi, y en el contexto de un valor numérico o intervalo expuesto en la presente En algunas modalidades, significa $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, o $\pm 3\%$ del valor numérico o intervalo mencionado o reivindicado.

A lo largo del texto de esta memoria descriptiva se citan varios documentos. Cada uno

de los documentos citados en la presente (que incluye todas las patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, etc.), ya sean supra o infra, se incorporan por referencia en su totalidad. Nada de lo aquí expuesto se debe interpretar como una admisión de que la invención no tiene derecho a ser anterior a dicha descripción en virtud de una invención anterior.

Agente de unión biespecífico

La primera molécula diana de los agentes de unión biespecíficos descritos en la presente es CLDN18.2.

Las claudinas son una familia de proteínas que son los componentes más importantes de las uniones estrechas, donde establecen la barrera paracelular que controla el flujo de moléculas en el espacio intercelular entre las células de un epitelio. Las claudinas son proteínas transmembrana que atraviesan la membrana 4 veces, con el extremo N-terminal y el C-terminal situados ambos en el citoplasma. El primer bucle extracelular, denominado EC1 o ECL1, consiste en una media de 53 aminoácidos, y el segundo bucle extracelular, denominado EC2 o ECL2, consiste en alrededor de 24 aminoácidos. Las proteínas de la superficie celular de la familia de las claudinas, tales como CLDN18.2, se expresan en tumores de diversos orígenes y son especialmente adecuadas como estructuras diana en relación con la inmunoterapia del cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (no se expresan en un tejido normal relevante desde el punto de vista de la toxicidad) y a su localización en la membrana plasmática.

CLDN18.2 se ha identificado como diferencialmente expresado en tejidos tumorales, y el estómago es el único tejido normal que expresa CLDN18.2. CLDN18.2 se expresa selectivamente en tejidos normales en células epiteliales diferenciadas de la mucosa gástrica. CLDN18.2 se expresa en cánceres de diversos orígenes, tales como carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y los tumores ENT. CLDN18.2 es una diana valiosa para la prevención y/o el tratamiento de tumores primarios, tales como cáncer gástrico, en particular adenocarcinoma gástrico, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica (GEJ), en particular adenocarcinoma de GEJ, cáncer de páncreas, en particular el adenocarcinoma pancreático, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon,

cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza–cuello, cáncer de vías biliares, cánceres de vesícula biliar, y metástasis de los mismos, en particular metástasis de cáncer gástrico, tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneales y metástasis de ganglios linfáticos. El término “claudina 18” o “CLDN18” se refiere a la claudina 18 e incluye cualquier variante, incluida la variante de empalme 1 de la claudina 18 (claudina 18.1 [CLDN18.1]) y la variante de empalme 2 de la claudina 18 (claudina 18.2 [CLDN18.2]).

El término “claudina 18.2” o “CLDN18.2” se refiere con preferencia a CLDN18.2 humana y, en particular, a una proteína que, con preferencia, consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. El primer bucle extracelular de CLDN18.2 comprende con preferencia los aminoácidos 27 a 81, con más preferencia los aminoácidos 29 a 78 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. El segundo bucle extracelular de CLDN18.2 comprende con preferencia los aminoácidos 140 a 180 o 144 a 167 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Dichos primer y segundo bucles extracelulares forman con preferencia la porción extracelular de CLDN18.2. En general, los anticuerpos descritos en la presente se unen a la porción extracelular de CLDN18.2 humana.

La segunda molécula diana de los agentes de unión biespecíficos descritos en la presente es CD3 (clúster de diferenciación 3), en particular CD3ε. El complejo CD3 denota un antígeno que se expresa en células T humanas maduras, timocitos y un subconjunto de células citolíticas naturales como parte del complejo multimolecular del receptor de células T (TCR). El correceptor de células T es un complejo proteico y está compuesto por cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3γ, una cadena CD3δ y dos cadenas CD3ε. Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de células T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación en los linfocitos T. El TCR, la cadena ζ y las moléculas CD3 forman el complejo TCR.

El CD3ε humano se indica en el número de acceso del GenBank NM_000733. El CD3γ humano se indica en el número de acceso del GenBank NM_000073. El CD3δ humano se indica en el número de acceso del GenBank NM_000732. CD3 es responsable de la transducción de señales del TCR. Como describen Lin y Weiss, Journal of Cell Science 114, 243–244 (2001), la activación del complejo TCR por la unión de epítomos de antígenos específicos presentados en MHC produce la fosforilación de motivos de activación basados

en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM) por quinasas de la familia Src, lo que desencadena el reclutamiento de otras quinasas que producen la activación de las células T, incluida la liberación de Ca^{2+} . La agrupación de CD3 en células T, por ejemplo mediante anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, lleva a una activación de células T similar a la del acoplamiento del receptor de células T, pero independiente de su especificidad típica de clon.

Como se utiliza en la presente, “CD3” incluye CD3 humano e indica un antígeno que se expresa en células T humanas como parte del complejo receptor de células T multimolecular. Con respecto a CD3, el agente de unión descrito en la presente reconoce con preferencia la cadena épsilon de CD3. En algunas modalidades, reconoce un epítipo que corresponde a los primeros 27 aminoácidos N-terminales de CD3 épsilon o fragmentos funcionales de este tramo de 27 aminoácidos.

De acuerdo con la invención, el término “cáncer CLDN18.2 positivo” o términos similares significan un cáncer que incluye células cancerosas que expresan CLDN18.2, con preferencia en la superficie de dichas células cancerosas.

“Superficie celular” se utiliza de acuerdo con su significado normal de la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por proteínas y otras moléculas.

CLDN18.2 se expresa en la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a las células.

CD3 se expresa en la superficie de las células si se localiza en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por anticuerpos específicos de CD3 añadidos a las células.

El término “porción extracelular” en el contexto de la presente invención se refiere a una parte de una molécula tal como una proteína que está orientada hacia el espacio extracelular de una célula y con preferencia es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por moléculas de unión a antígenos tales como anticuerpos situados fuera de la célula. Con preferencia, el término se refiere a uno o más bucles o dominios extracelulares o a un fragmento de los mismos.

Los términos “parte” o “fragmento” se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a cualquier porción de una estructura, tal como una secuencia de aminoácidos, que es más pequeña que la estructura completa. En algunas modalidades, una parte de una estructura se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. En algunas modalidades, una parte de una estructura se refiere a más de un elemento continuo de dicha estructura cuyos elementos pueden estar conectados. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura comprenden con preferencia una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Una parte o fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende con preferencia una secuencia de al menos 4, en particular al menos 6, al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50, o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia de proteína.

“Fragmento”, en referencia a una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína), se refiere a una parte de una secuencia de aminoácidos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de aminoácidos acortada en el extremo N-terminal y/o C-terminal. Un fragmento acortado en el extremo C-terminal (fragmento N-terminal) se obtiene, por ejemplo, mediante la traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 3' del marco de lectura abierto. Un fragmento acortado en el extremo N-terminal (fragmento C-terminal) se puede obtener, por ejemplo, mediante la traducción de un marco de lectura abierto truncado que carece del extremo 5' del marco de lectura abierto, siempre que el marco de lectura abierto truncado comprenda un codón de inicio que sirva para iniciar la traducción. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende, por ejemplo, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % de los residuos de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos.

Por “variante” de una secuencia de aminoácidos o expresiones similares se entiende una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de aminoácidos original en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos original puede ser una secuencia de aminoácidos natural o de tipo salvaje (WT), o puede ser una versión modificada de una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje. Con preferencia, la variantes de la secuencia de aminoácidos tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos original, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 20 modificaciones de aminoácidos, y con preferencia de 1 a aproximadamente 10 o de 1 a aproximadamente 5 modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos original.

Por “tipo salvaje” o “WT” o “nativo” utilizado con respecto a una secuencia de aminoácidos en la presente se entiende una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza, que incluye las variaciones alélicas. Una secuencia de aminoácidos, péptido o proteína de tipo salvaje es una secuencia de aminoácidos que no ha sido modificada intencionadamente.

A efectos de la presente descripción, las “variantes” de una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido) comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de supresión de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. El término “variante” incluye todos los mutantes, variantes de empalme, variantes modificadas postraduccionalmente, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular las que se producen de forma natural. El término “variante” incluye, en particular, fragmentos de una secuencia de aminoácidos.

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

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

Las variantes de supresión de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como mediante la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 o más aminoácidos. Las supresiones pueden estar en cualquier posición de la proteína. Las variantes de supresión de aminoácidos que comprenden la supresión en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína también se denominan variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo de la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. Se da preferencia a que las modificaciones se produzcan en posiciones de la secuencia de aminoácidos que no

estén conservadas entre proteínas o péptidos homólogos y/o a que se reemplacen aminoácidos con otro que tienen propiedades similares. Con preferencia, los cambios de aminoácidos en las variantes de péptidos y proteínas son cambios de aminoácidos conservadores, es decir, sustituciones de aminoácidos con carga o sin carga similares. Un cambio conservador de aminoácidos implica la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales.

En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservadoras se pueden definir por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en la siguiente tabla:

Residuos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Residuos básicos	Lys (K), Arg (R), y His (H)
Residuos hidrofílicos no cargados	Ser (S), Thr (T), Asn (N), y Gln (Q)
Residuos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), e Ile (I)
Residuos no polares sin carga	Cys (C), Met (M), y Pro (P)
Residuos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y), y Trp (W)

Con preferencia, el grado de similitud, con preferencia identidad, entre una secuencia de aminoácidos dada y una secuencia de aminoácidos que sea una variante de dicha secuencia de aminoácidos dada será de al menos aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. A este respecto, el término “al menos 80 % de identidad de secuencia”, tal como se utiliza en la presente con respecto a una secuencia de aminoácidos dada, incluye secuencias de aminoácidos que tienen un nivel de identidad con la secuencia de aminoácidos dada de al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %. El grado de similitud o identidad se da con preferencia para una región de aminoácidos que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o identidad se da con preferencia para al

menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, En algunas modalidades, aminoácidos continuos. En algunas modalidades, el grado de similitud o identidad se da para la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencias, con preferencia la identidad de secuencias, se puede realizar con herramientas de la técnica conocidas, con preferencia utilizando el mejor alineamiento de secuencias, por ejemplo, utilizando Align, utilizando configuraciones estándar, con preferencia EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0. Gap Extend 0,5.

La “similitud de secuencia” indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La “identidad de secuencia” entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias. La “identidad de secuencia” entre dos secuencias de ácidos nucleicos indica el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

Los términos “% idéntico”, “% de identidad” o términos similares se refieren, en particular, al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos que son idénticos en un alineamiento óptimo entre las secuencias que se deben comparar. Dicho porcentaje es puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias pueden estar distribuidas aleatoriamente, aunque no necesariamente en toda la longitud de las secuencias para comparar. Las comparaciones de dos secuencias normalmente se llevan a cabo mediante la comparación de las secuencias, después del alineamiento óptimo, con respecto a un segmento o “ventana de comparación”, con el fin de identificar regiones locales de secuencias correspondientes. El alineamiento óptimo para una comparación se puede realizar manualmente o con ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. Math.* 2, 482, con la ayuda del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, con la ayuda del algoritmo de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, o con la ayuda de programas informáticos que usan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.). En algunas modalidades, el porcentaje de identidad de dos secuencias se determina utilizando el algoritmo BLASTN o BLASTP, disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) (por ejemplo, en

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK
_LOC=align2seq). En algunas modalidades, los parámetros del algoritmo utilizados para el
algoritmo BLASTN en el sitio web del NCBI incluyen: (i) Umbral de expectativa establecido en
10; (ii) Tamaño de palabra establecido en 28; (iii) Coincidencias máximas en un intervalo de
5 consulta establecido en 0; (iv) Puntuaciones de coincidencias/No coincidencias establecidos
en 1, -2; (v) Costos de la brecha establecido en Lineal; y (vi) se utiliza el filtro para regiones
de baja complejidad. En algunas modalidades, los parámetros del algoritmo utilizados para el
algoritmo BLASTP en el sitio web del NCBI incluyen: (i) Umbral de expectativa fijado en 10;
(ii) Tamaño de palabra establecido en 3; (iii) Máximo de coincidencias en un intervalo de
10 consulta establecido en 0; (iv) Matriz establecida en BLOSUM62; (v) Costos de brecha
establecidos en Existencia: 11 Extensión: 1; y (vi) ajuste condicional de la matriz de puntuación
composicional.

El porcentaje de identidad se obtiene mediante la determinación del número de
posiciones idénticas en las que se corresponden las secuencias para comparar, dividir este
15 número por el número de posiciones comparadas (por ejemplo, el número de posiciones de
la secuencia de referencia) y multiplicar este resultado por 100.

En algunas modalidades, el grado de similitud o identidad se da para una región que
es al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos
aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al
20 menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos
aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o
aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia de referencia. Por ejemplo,
si la secuencia de referencia de ácidos nucleicos consiste en 200 nucleótidos, el grado de
identidad se da para al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 110, al
25 menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 130, al menos aproximadamente
140, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 160, al menos
aproximadamente 170, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 190, o
aproximadamente 200 nucleótidos, En algunas modalidades, nucleótidos continuos. En
algunas modalidades, el grado de similitud o identidad se da para la longitud completa de la
30 secuencia de referencia.

Las secuencias de aminoácidos homólogas exhiben de acuerdo con la descripción al

menos 40 %, en particular al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % y con preferencia al menos 95 %, al menos 98 o al menos 99 % de identidad de los residuos de aminoácidos con la secuencia de referencia.

5 Las variantes de secuencia de aminoácidos descritas en la presente pueden ser preparadas fácilmente por el experto, por ejemplo, mediante la manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para preparar péptidos o proteínas que tienen sustituciones, adiciones, inserciones o supresiones, se describe en detalle por ejemplo, en Sambrook et al. (1989). Además, los péptidos y variantes de aminoácidos descritos en la presente se pueden preparar fácilmente con la ayuda de técnicas conocidas
10 de síntesis de péptidos tal como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida y métodos similares.

En algunas modalidades, un fragmento o variante de una secuencia de aminoácidos (péptido o proteína) es con preferencia un “fragmento funcional” o una “variante funcional”. El término “fragmento funcional” o “variante funcional” de una secuencia de aminoácidos se
15 refiere a cualquier fragmento o variante que presenta una o más propiedades funcionales idénticas o similares a las de la secuencia de aminoácidos de la que deriva, es decir, es funcionalmente equivalente. Con respecto a los dominios de unión a antígeno que comprenden variantes funcionales VH y VL, una función particular es retener la unión de dicho dominio de unión. El término “fragmento funcional” o “variante funcional”, tal como se utiliza
20 en la presente, se refiere en particular a una variante de molécula o secuencia que comprende una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula o secuencia original y que sigue siendo capaz de cumplir una o más, o todas, las funciones de la molécula o secuencia original, por ejemplo, formar un dominio de unión para un antígeno particular. Por ejemplo, un dominio de unión que
25 comprende variantes funcionales VH y VL o variantes de secuencia de CDR funcionales tiene las mismas o similares características de unión en comparación con la molécula original. En algunas modalidades, las modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la molécula o secuencia original no afectan o alteran significativamente las características de la molécula o secuencia. En otras modalidades, las características de una molécula que comprende el
30 fragmento funcional o variante funcional, por ejemplo, las características de unión, tales como la fuerza de unión de un dominio de unión, se pueden reducir pero seguir estando presentes de forma significativa, por ejemplo, las características de unión, tales como la fuerza de unión del dominio de unión que comprende la variante funcional, pueden ser al menos 50 %, al

menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % de la molécula o secuencia original. Por ejemplo, una variante funcional puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, o más inserciones de aminoácidos, adiciones de aminoácidos, sustituciones de aminoácidos y/o supresiones de aminoácidos en comparación con la molécula original. Sin embargo, en otras modalidades, las características de la molécula que comprende la variante funcional o el fragmento funcional, por ejemplo, las características de unión de un dominio de unión que comprende el fragmento funcional o la variante funcional, se pueden mejorar en comparación con la molécula original. En algunas modalidades, una “variante funcional” es un “fragmento funcional”, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se acorta en el extremo N-terminal y/o C-terminal en comparación con la molécula original, pero conserva o retiene esencialmente una o más, o todas, las funciones de la molécula original, como se ha descrito anteriormente, y en particular es funcionalmente equivalente a la molécula original.

El término “variante funcional” de una secuencia de aminoácidos incluye fragmentos “funcionales” de dicha secuencia de aminoácidos.

Una secuencia de aminoácidos (péptido, proteína o polipéptido, por ejemplo, VH, VL, CH1, CH2 o CH3) “derivada de” una secuencia de aminoácidos designada (péptido, proteína o polipéptido, por ejemplo, VH, VL, CH1, CH2 o CH3) se refiere al origen de la primera secuencia de aminoácidos. Con preferencia, la secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de aminoácidos particular tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, esencialmente idéntica u homóloga a esa secuencia particular o a un fragmento de la misma. Las secuencias de aminoácidos derivadas de una secuencia particular de aminoácidos pueden ser variantes de esa secuencia particular o un fragmento de la misma, con preferencia variantes funcionales de la misma como se describe en la presente, que incluyen fragmentos funcionales. Por ejemplo, un experto en la técnica entenderá que las secuencias de aminoácidos adecuadas para su uso en la presente se pueden alterar de manera que varíen en la secuencia, que incluye inserciones de aminoácidos, supresiones de aminoácidos, adiciones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos, a partir de las secuencias naturales o nativas de las que se derivaron, mientras que conservan o esencialmente conservan la actividad deseable de las secuencias nativas. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de los dominios de VH, VL, CH1, CH2 y/o CH3 de las cadenas peptídicas del agente de unión descrito en la presente se derivan de las secuencias de aminoácidos de Los dominios de VH, VL, CH1, CH2 y/o CH3 de las inmunoglobulinas pero se pueden alterar en comparación con los dominios de los que derivan. Por ejemplo, un dominio VL de un agente

de unión descrito en la presente puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más inserciones de aminoácidos, adiciones de aminoácidos, supresiones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio VL del que deriva. Con preferencia, una VH o VL que tenga una

5 secuencia de aminoácidos que sea una variante funcional de la secuencia de aminoácidos del VH o VL original proporciona las mismas o esencialmente las mismas funciones que la secuencia de aminoácidos del VH o VL original, por ejemplo, en términos de especificidad de unión, fuerza de unión, etc. Sin embargo, como sabrá un experto en la técnica, En algunas modalidades, también puede ser preferible proporcionar una variante funcional de una

10 secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de una VH o VL, que tenga características alteradas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula original. Las mismas consideraciones se aplican a las secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, CDR, y a otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, las de los dominios CH1, CH2, CH3 y/o CL. Por ejemplo, de acuerdo con la invención, una VH o VL derivada de una inmunoglobulina

15 comprende una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de la respectiva VH o VL del que deriva, o puede diferir en una o más posiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la respectiva VH o VL original. Por ejemplo, un dominio VH de un agente de unión descrito en la presente puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más inserciones de aminoácidos, adiciones

20 de aminoácidos, supresiones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio VH del que deriva. Por ejemplo, un dominio VL de un agente de unión descrito en la presente puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más inserciones de aminoácidos, adiciones de aminoácidos, supresiones de aminoácidos y/o sustituciones de aminoácidos en

25 comparación con la secuencia de aminoácidos del dominio VL del que se deriva. Con preferencia, una VH o VL que tiene una secuencia de aminoácidos que sea una variante funcional de la secuencia de aminoácidos de la VH o VL original proporciona las mismas o esencialmente las mismas funciones que la secuencia de aminoácidos de la VH o VL original, por ejemplo, en términos de especificidad de unión, fuerza de unión, etc. Sin embargo, como

30 sabrá un experto en la técnica, En algunas modalidades, también puede ser preferible proporcionar una variante funcional de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, de una VH o VL, que tiene características alteradas en comparación con la secuencia de aminoácidos de la molécula original. Las mismas consideraciones se aplican a las secuencias de aminoácidos de, por ejemplo, CDR, y a otras secuencias de aminoácidos, por ejemplo, las de

35 los dominios CH1, CH2, CH3 y/o CL.

Cuando se describe que un agente de unión biespecífico comprende una VH “derivada de” una inmunoglobulina y una VL “derivada de” la misma inmunoglobulina u otra diferente, el término “derivado de” indica que el agente de unión biespecífico se generó mediante la recombinación, por cualquier método conocido, de dicha VH y VL de dichas inmunoglobulinas en el agente de unión biespecífico resultante. En este contexto, “recombinación” no pretende limitarse a ningún método particular de recombinación y, por lo tanto, incluye todos los métodos para producir agentes de unión biespecíficos descritos en la presente o conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, la recombinación a nivel de ácido nucleico y/o mediante la coexpresión de diferentes moléculas en las mismas células.

El término “biespecífico” utilizado en el contexto de un agente como un anticuerpo, una molécula derivada de anticuerpo o cualquier otro agente se refiere a un agente que tiene dos dominios de unión a antígeno diferentes definidos por secuencias de aminoácidos diferentes. En algunas modalidades, dichos dominios de unión a antígeno diferentes se unen a epítopos diferentes en el mismo antígeno, o como se analiza más adelante, se pueden unir al mismo epítipo en el mismo antígeno. Sin embargo, en las modalidades preferidas, dichos dominios de unión a antígeno diferentes se unen a antígenos diana diferentes. Un agente de unión se puede unir a cada uno de los diferentes antígenos o diferentes epítopos con uno, dos o más dominios de unión, es decir, unirse a cada uno de los diferentes antígenos o diferentes epítopos de forma monovalente, divalente (o bivalente), trivalente, tetravalente e incluso con valencia de orden superior. En el caso de un anticuerpo biespecífico trivalente, dos de los dominios de unión se unen a una diana (ya sea al mismo epítipo o a otro diferente) y el otro, por ejemplo a una segunda diana.

CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión es inferior en comparación con la expresión en células estomacales o tejido estomacal. Con preferencia, el nivel de expresión es menor de 10 %, con preferencia menor de 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,05 % de la expresión en células estomacales o tejido estomacal o incluso inferior. Con preferencia, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión supera el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto del estómago en no más de 2 veces, con preferencia 1,5 veces, y con preferencia no supera el nivel de expresión en dicho tejido no canceroso. Con preferencia, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a la célula.

CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión supera el nivel de expresión en tejido no canceroso distinto del estómago con preferencia en más de 2 veces, con preferencia 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces. Con preferencia, CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es lo suficientemente alto como para permitir la unión por anticuerpos específicos de CLDN18.2 añadidos a la célula. Con preferencia, el CLDN18.2 expresado en una célula se expresa o se expone en la superficie de dicha célula.

De acuerdo con la invención, el término “enfermedad” se refiere a cualquier estado patológico, incluido el cáncer, en particular las formas de cáncer descritas en la presente. Cualquier referencia en la presente al cáncer o a formas particulares de cáncer también incluye la metástasis del mismo. En una modalidad preferida, una enfermedad para tratar de acuerdo con la presente enseñanza incluye células que expresan CLDN18.2.

“Enfermedad que incluye células que expresan CLDN18.2”, “enfermedad asociada a células que expresan CLDN18.2” o expresiones similares, tal como se utilizan en la presente, significan que CLDN18.2 se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. En algunas modalidades, la expresión de CLDN18.2 en células de un tejido u órgano enfermo está aumentada en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos 10 %, en particular al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10000 % o incluso más. En algunas modalidades, la expresión sólo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano está reprimida. De acuerdo con la invención, las enfermedades asociadas con células que expresan CLDN18.2 incluyen enfermedades cancerosas. De acuerdo con la invención, las enfermedades cancerosas son con preferencia aquellas en las que las células cancerosas expresan CLDN18.2.

Como se usa en la presente, una “enfermedad cancerosa” o “cáncer” incluye una enfermedad caracterizada por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celular aberrantemente regulados. Por “célula cancerosa” se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida e incontrolada y que continúa creciendo después de que cesen los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Con preferencia, una “enfermedad cancerosa” se caracteriza por células que expresan CLDN18.2 y una célula cancerosa que expresa CLDN18.2. Una célula que expresa CLDN18.2 es con

preferencia una célula cancerosa, con preferencia de los cánceres descritos en la presente.

El término “cáncer” de acuerdo con la invención comprende leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, linfomas, neuroblastomas, gliomas, cáncer rectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de sangre, cáncer de piel, cáncer de cerebro, cáncer cervical, cáncer intestinal, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vías biliares, cáncer gastrointestinal, cáncer de ganglios linfáticos, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica (UGE), cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de oído, nariz y garganta (ENT), cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de ovario y cáncer de pulmón y sus metástasis. Los ejemplos de estos son carcinomas de pulmón, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas de colon, carcinomas de células renales, carcinomas de cuello uterino o las metástasis de los tipos de cáncer o tumores descritos anteriormente. El término cáncer de acuerdo con la invención también comprende metástasis del cáncer.

De acuerdo con la invención, un “carcinoma” es un tumor maligno derivado de células epiteliales. Este grupo representa los cánceres más comunes, que incluyen las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon.

“Adenocarcinoma” es un cáncer que se origina en el tejido glandular. Este tejido también forma parte de una categoría de tejidos más amplia conocida como tejido epitelial. El tejido epitelial incluye la piel, las glándulas y una variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y los órganos del cuerpo. El epitelio deriva embriológicamente del ectodermo, endodermo y mesodermo. Para clasificarse como adenocarcinoma, las células no deben necesariamente formar parte de una glándula, siempre que tengan propiedades secretoras. Esta forma de carcinoma puede aparecer en algunos mamíferos superiores, incluido el ser humano. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular del que derivan, mientras que los mal diferenciados pueden no hacerlo. Al teñir las células de una biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma o algún otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas pueden surgir en muchos tejidos del cuerpo debido a la naturaleza ubicua de las glándulas en el organismo. Aunque puede que cada glándula no segregue la misma sustancia, siempre que la célula tenga una función exocrina, se considera glandular y, por tanto, su forma maligna se denomina adenocarcinoma. Los adenocarcinomas malignos

invaden otros tejidos y a menudo hacen metástasis si se les da tiempo suficiente para ello. El adenocarcinoma de ovario es el tipo más común de carcinoma de ovario. Incluye los adenocarcinomas seroso y mucinoso, el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometriode.

5 Por “metástasis” se entiende la propagación de células cancerosas desde su localización original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos y, a continuación, después de ser transportadas por la
10 sangre, su infiltración en los órganos diana. Por último, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo se produce incluso después de la extirpación del tumor primario, ya que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En algunas modalidades, el término “metástasis” de acuerdo con la invención se refiere a “metástasis a distancia”, que se refiere
15 a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales. En algunas modalidades, el término “metástasis” de acuerdo con la invención se refiere a la metástasis en los ganglios linfáticos. Una forma particular de metástasis que es tratable utilizando la terapia o métodos de tratamiento de la invención es la metástasis originada a partir de cáncer gástrico como sitio primario. En modalidades preferidas, tales
20 metástasis de cáncer gástrico son tumores de Krukenberg, metástasis peritoneales y/o metástasis de ganglios linfáticos.

El tumor de Krukenberg es un tumor metastásico poco frecuente del ovario que representa de 1 % a 2 % de todos los tumores ováricos. El pronóstico del tumor de Krukenberg sigue siendo muy malo y no existe ningún tratamiento establecido para el tumor de Krukenberg.
25 El tumor de Krukenberg es un adenocarcinoma metastásico de células en anillo de sello del ovario. El estómago es el sitio primario en la mayoría de los casos de tumor de Krukenberg (70 %). Los carcinomas de colon, apéndice y mama (principalmente carcinoma lobular invasivo) son los siguientes sitios primarios más frecuentes. Se han descrito casos raros de tumor de Krukenberg originado por carcinomas de vesícula biliar, vías biliares, páncreas,
30 intestino delgado, ampolla de Vater, cuello uterino y vejiga urinaria/uraco.

Por “tratar” se entiende administrar un compuesto o composición o una combinación

de compuestos o composiciones a un sujeto con el fin de prevenir, mejorar o eliminar una enfermedad, incluida la reducción del tamaño de un tumor o del número de tumores en un sujeto; detener o lentificar una enfermedad en un sujeto; inhibir o lentificar el desarrollo de una nueva enfermedad en un sujeto; disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o
5 recurrencias en un sujeto que padece actualmente o ha padecido previamente una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar la esperanza de vida del sujeto.

En particular, el término “tratamiento de una enfermedad” incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, lentificar o inhibir la progresión o el empeoramiento, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

10 En el contexto de la presente invención, términos como “proteger”, “prevenir”, “profiláctico”, “preventivo” o “protector” se refieren a la prevención o tratamiento, o ambos, de la aparición y/o propagación de una enfermedad en un sujeto y, en particular, a minimizar la posibilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad o a retrasar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una persona con riesgo de cáncer sería candidata a una terapia
15 para prevenir el cáncer.

Por “estar en riesgo” se entiende un sujeto al que se identifica con una probabilidad superior a la normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha tenido o que tiene actualmente una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un riesgo mayor de desarrollar una
20 enfermedad, ya que dicho sujeto puede seguir desarrollando una enfermedad. Los sujetos que actualmente padecen o han padecido un cáncer también tienen un mayor riesgo de sufrir metástasis cancerosas.

Los términos “individuo” y “sujeto” se utilizan aquí indistintamente. Se refieren a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, vacuno, cerdo, oveja,
25 caballo o primate) que puede estar afectado o es susceptible de padecer una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), pero que puede o no tener la enfermedad o trastorno. En muchas modalidades, el individuo o sujeto es un ser humano. A menos que se indique lo contrario, los términos “individuo” y “sujeto” no indican una edad particular, por lo que abarcan adultos, ancianos, niños y recién nacidos. En algunas modalidades de la presente descripción,
30 el “individuo” o “sujeto” es un “paciente”.

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

Por “célula diana” se entenderá cualquier célula indeseable, tal como una célula cancerosa. En modalidades preferidas, la célula diana expresa CLDN18.2.

“Activación” o “estimulación”, tal como se utiliza en la presente, se refiere al estado de una célula efectora inmunitaria, tal como una célula T, que ha sido suficientemente estimulada
10 para inducir una proliferación celular detectable. La activación también se puede asociar con la iniciación de vías de señalización, la producción inducida de citoquinas y funciones efectoras detectables. El término “células efectoras inmunitarias activadas” se refiere, entre otras cosas, a células efectoras inmunitarias que están experimentando división celular.

El término “cebado” se refiere a un proceso en el que una célula efectora inmunitaria,
15 tal como una célula T, tiene su primer contacto con su antígeno específico y provoca la diferenciación en células efectoras, tales como las células T efectoras.

El término “expansión clonal” o “expansión” se refiere a un proceso en el que se multiplica una entidad específica. En el contexto de la presente descripción, el término se utiliza con preferencia en el contexto de una respuesta inmunológica en la que las células
20 efectoras inmunitarias son estimuladas por un antígeno, proliferan y se amplifica la célula efectora inmunitaria específica que reconoce dicho antígeno. Con preferencia, la expansión clonal conduce a la diferenciación de las células efectoras inmunitarias.

Como se usa en la presente, el término “interactuar” significa que dos especies moleculares, por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas o porciones de las mismas, se asocian
25 físicamente entre sí. La asociación que se caracteriza como una interacción puede implicar interacciones no covalentes y/o covalentes, con preferencia no covalentes, por ejemplo, interacciones carga–carga, interacciones carga–dipolo, interacciones dipolo–dipolo, fuerzas de Van der Waals, enlace de hidrógeno y/o fuerzas hidrofóbicas.

El término “unir” o “unión” se refiere a la interacción no covalente con una diana. En algunas modalidades, el término “unir” o “unión” se refiere a una unión específica. Por el término “unión específica” o “se une específicamente”, tal como se utiliza en la presente, se entiende una molécula tal como un anticuerpo que reconoce una molécula diana específica, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra o en un sujeto. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de otra u otras especies. Sin embargo, dicha reactividad cruzada de especies no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también se puede unir a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, dicha reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico.

En algunos casos, el término “unión específica” o “se une específicamente”, se puede utilizar en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítopo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítopo “A”, la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre, no marcado), en una reacción que contiene “A” marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

En la presente se describen restos de unión y agentes de unión que se unen a CLDN18.2 y/o CD3. Dichos restos y agentes de unión pueden formar complejos con CLDN18.2 y/o CD3.

El término “agente de unión” como se usa en la presente se refiere a cualquier agente capaz de unirse a los antígenos deseados. Un agente de unión también puede comprender elementos sintéticos, modificados o no naturales. Dichas moléculas, por ejemplo, pueden unir funcionalidades o regiones de unión a antígenos deseadas, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. En algunas modalidades, un agente de unión es un constructo sintético que comprende CDR de unión a antígeno o regiones variables. En algunas modalidades, los agentes de unión descritos en la presente comprenden agentes de unión biespecíficos o multispecíficos tales como agentes de unión derivados de anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer y un segundo dominio de unión, en los que el primer

dominio de unión es capaz de unirse a CLDN18.2 y el segundo dominio de unión es capaz de unirse a CD3.

El término “dominio de unión” o “dominio de unión a antígeno” utilizado en la presente se refiere a cualquier región, resto, grupo o dominio que interactúa con un antígeno. En algunas modalidades, el término “dominio de unión” o “dominio de unión a antígeno” se refiere al sitio de un agente de unión descrito en la presente, que se une a un antígeno e incluye la porción de unión a antígeno de un agente de unión. En ciertas modalidades, el dominio de unión es o comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o cualquier otra proteína de unión, o cualquier combinación de los mismos. El dominio de unión puede estar compuesto por dominios variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VL), cada uno de los cuales incluye cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres CDR. Las CDR varían en secuencia y determinan la especificidad para un antígeno particular. Los dominios VH y VL juntos pueden formar el sitio que se une, por ejemplo, se une específicamente, a un antígeno particular. Un “dominio de unión para” un antígeno designa un dominio de unión, por ejemplo, de un agente de unión descrito en la presente, que se une a dicho antígeno y con preferencia se une específicamente a dicho antígeno.

De acuerdo con la presente invención, un agente tal como un anticuerpo es capaz de unirse a una diana predeterminada si tiene una afinidad significativa por dicha diana predeterminada y se une a dicha diana predeterminada en ensayos estándar. “Afinidad” o “afinidad de unión” se mide a menudo por la constante de disociación de equilibrio (K_D). Con preferencia, el término “afinidad significativa” se refiere a la unión a una diana predeterminada con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o menor, 10^{-6} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, o 10^{-12} M o menor.

Un agente no es (sustancialmente) capaz de unirse a una diana si no tiene afinidad significativa por dicha diana y no se une significativamente, en particular no se une de forma detectable, a dicha diana en ensayos estándar. Con preferencia, el agente no se une de forma detectable a dicha diana si está presente en una concentración de hasta 2, con preferencia 10, con más preferencia 20, en particular 50 o 100 $\mu\text{g/ml}$ o superior. Con preferencia, un agente no tiene afinidad significativa por una diana si se une a dicha diana con un K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces mayor que la K_D de unión a la diana predeterminada a la que el agente es capaz de unirse. Por ejemplo, si la

K_D de unión de un agente a la diana a la que el agente es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D de unión a una diana por la que el agente no tiene afinidad significativa sería al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

Un agente de unión tal como un anticuerpo es específico para una diana predeterminada si es capaz de unirse a dicha diana predeterminada mientras que no es capaz de unirse a otras dianas, es decir, no tiene afinidad significativa por otras dianas y no se une significativamente a otras dianas en ensayos estándar. De acuerdo con la invención, un agente de unión es específico para CLDN18.2 si es capaz de unirse a CLDN18.2 pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otras dianas. Con preferencia, un agente de unión es específico para CLDN18.2 si la afinidad por y la unión a tales otras dianas no supera significativamente la afinidad por o la unión a proteínas no relacionadas con CLDN18.2, tales como albúmina sérica bovina (BSA), caseína, albúmina sérica humana (HSA) o proteínas transmembrana no claudina, tales como moléculas MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Con preferencia, un agente de unión es específico para una diana predeterminada si se une a dicha diana con una K_D que es al menos 10 veces, 100 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces menor que la K_D para la unión a una diana para la que no es específico. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un agente de unión a la diana para la que es específico es 10^{-7} M, la K_D para la unión a una diana para la que no es específico debería ser al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

El término " k_d " (seg^{-1}), tal como se usa en la presente, se refiere a la constante de la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina valor k_{off} .

El término " K_D " (M), tal como se usa en la presente, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

La unión de un agente de unión a una diana se puede determinar experimentalmente utilizando cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), y los métodos descritos en la presente. Las afinidades se pueden determinar fácilmente mediante técnicas convencionales, tal como diálisis de equilibrio; mediante el uso del instrumento

BIAcore 2000, utilizando los procedimientos generales descritos por el fabricante; mediante radioinmunoensayo usando antígeno diana radiomarcado; o mediante otro método conocido por los expertos. Los datos de afinidad se pueden analizar, por ejemplo, por el método de Scatchard et al., Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). La afinidad medida de una interacción particular entre el agente de unión y el antígeno puede variar si se mide en condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se realizan con preferencia con soluciones estandarizadas de agente de unión y antígeno, y un amortiguador estandarizado.

El término “compite” se refiere a la competición entre dos agentes de unión, tales como los anticuerpos, para unirse a un antígeno diana. Si dos agentes de unión no se bloquean entre sí para unirse a un antígeno diana, dichos agentes de unión no compiten y esto es una indicación de que dichos agentes de unión no se unen a la misma parte, es decir, al epítipo del antígeno diana. Un experto en la técnica sabe muy bien cómo analizar la competición de los agentes de unión para unirse a un antígeno diana. Un ejemplo de este método es el denominado ensayo de competencia cruzada, que se puede realizar, por ejemplo, como ELISA o mediante citometría de flujo.

Dos agentes de unión, tales como los anticuerpos, tienen la “misma especificidad” si se unen al mismo antígeno y al mismo epítipo. Dichos agentes de unión pueden competir por la unión en un ensayo de unión competitiva. En algunas modalidades, se considera que los agentes de unión que se unen al mismo epítipo se unen a los mismos aminoácidos de la molécula diana. Se puede determinar que los anticuerpos se unen al mismo epítipo en un antígeno diana mediante experimentos estándar de barrido de alanina o experimentos de cristalización de anticuerpo–antígeno conocidos por un experto en la técnica.

La capacidad de los agentes de unión para competir por la unión a un antígeno indica que estos agentes de unión se pueden unir a la misma región epitópica del antígeno o, cuando se unen a otro epítipo, impiden estéricamente la unión de los agentes de unión a esa región epitópica particular. Los agentes de unión competidores se pueden identificar fácilmente sobre la base de su capacidad para competir con uno o más agentes de unión en ensayos de unión estándar tal como análisis de resonancia de plasmón superficial, ensayos ELISA o citometría de flujo (ver WO 2013/173223). Por ejemplo, la competición entre agentes de unión se puede detectar mediante un ensayo de bloqueo cruzado. Por ejemplo, se puede realizar un ensayo

ELISA competitivo mediante el recubrimiento del antígeno diana en los pozos de una placa de microtitulación y adición de un agente de unión a antígeno y un agente de unión de prueba candidato competidor. La cantidad de agente de unión a antígeno unido al antígeno en el pozo se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión del candidato a agente de unión de prueba competidor que compite con él por la unión, por ejemplo, al mismo epítipo. Específicamente, cuanto mayor sea la afinidad del agente de unión de prueba candidato competidor por el mismo epítipo, menor será la cantidad de agente de unión a antígeno unido al pozo recubierto de antígeno. La cantidad del agente de unión a antígeno unido al pozo se puede medir mediante la marcación del agente de unión con sustancias de marcado detectables o medibles. Como se describe en el documento WO 2013/173223 y como se conoce en la técnica, el análisis de resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, utilizando un instrumento Biacore, se puede utilizar para identificar regiones epitópicas superpuestas versus regiones epitópicas diferentes reconocidas por los agentes de unión. Alternativamente, la competición se puede determinar utilizando interferometría de biocapa.

Un agente de unión que compite por la unión a un antígeno con otro agente de unión, por ejemplo, un agente de unión que comprende regiones variables de cadena pesada y liviana como se describe en la presente, o un agente de unión que tiene la especificidad para un antígeno de otro agente de unión, por ejemplo, un agente de unión que comprende regiones variables de cadena pesada y liviana como se describe en la presente, tal como un anticuerpo, puede ser un agente de unión que comprende variantes de dichas regiones variables de cadena pesada y/o liviana como se describe en la presente, por ejemplo, modificaciones en las CDR y/o un cierto grado de identidad como se describe en la presente.

El término “antígeno” se refiere a una molécula tal como una proteína o un péptido que comprende un epítipo contra el que se dirige y/o se debe dirigir un agente, con preferencia para inducir una respuesta inmunitaria. En algunas modalidades, un antígeno o un producto del procesamiento del mismo, tal como un epítipo de células T, está unido a un receptor de células T o B, o a una molécula de inmunoglobulina, tal como un anticuerpo. Por consiguiente, un antígeno o un producto de procesamiento del mismo puede reaccionar específicamente con anticuerpos o linfocitos T (células T). En una modalidad preferida, un antígeno es un antígeno asociado a un tumor, tal como CLDN18.2, es decir, un constituyente de las células cancerosas que se puede derivar del citoplasma, la superficie celular y el núcleo celular, en particular aquellos antígenos que se producen, con preferencia en gran cantidad, en forma intracelular o como antígenos de superficie en las células cancerosas.

En el contexto de la presente invención, el término “antígeno asociado a tumor” o “antígeno asociado a cáncer” se refiere con preferencia a proteínas que, en condiciones normales, se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/u órganos o en etapas de desarrollo específicas y se expresan o se expresan de forma aberrante en uno o
5 más tejidos tumorales o cancerosos. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia con preferencia a la superficie celular de una célula cancerosa y con preferencia no se expresa o se expresa solo raramente en tejidos normales.

El término “epítopo” se refiere a un determinante antigénico en una molécula, por ejemplo, a la parte en una molécula que es reconocida por el sistema inmunitario, por ejemplo,
10 que es reconocida por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítomos son los sitios discretos y tridimensionales de un antígeno, que son reconocidos por el sistema inmunitario. Los epítomos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los
15 epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes. Un epítopo de una proteína comprende con preferencia una porción continua o discontinua de dicha proteína y tiene con preferencia entre 5 y 100, con preferencia entre 5 y 50, con más preferencia entre 8 y 30, con más preferencia entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítopo
20 puede tener con preferencia 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

El término “inmunoglobulina” se refiere a proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas, con preferencia a receptores de antígenos tales como los anticuerpos o el receptor de células B (BCR). Las inmunoglobulinas se caracterizan por un dominio estructural,
25 es decir, el dominio de inmunoglobulina, que tiene un plegado característico de inmunoglobulina (Ig). El término abarca inmunoglobulinas unidas a membranas e inmunoglobulinas solubles. Las inmunoglobulinas solubles en general se denominan anticuerpos. Las inmunoglobulinas en general comprenden varias cadenas, normalmente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas livianas idénticas unidas por enlaces disulfuro.
30 Estas cadenas se componen principalmente de dominios de inmunoglobulina, tales como el dominio VL (cadena ligera variable), el dominio CL (cadena ligera constante), el dominio VH (cadena pesada variable) y los dominios CH (cadena pesada constante) CH1, CH2, CH3 y CH4. Existen cinco tipos de cadenas pesadas de inmunoglobulinas de mamíferos,

específicamente, α , δ , ϵ , γ , y μ que representan las diferentes clases de inmunoglobulinas, es decir, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las clases de inmunoglobulinas también se denominan “isotipos” (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) en referencia a la clase de inmunoglobulina codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

5 Cuando en la presente se menciona un isotipo particular, por ejemplo IgG1, el término no se limita a una secuencia de isotipo específica, por ejemplo una secuencia IgG1 particular, sino que se utiliza para indicar que el anticuerpo está más próximo en secuencia a ese isotipo, por ejemplo IgG1, que a otros isotipos. A diferencia de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas solubles, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de membrana o de
10 superficie comprenden un dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático en su extremo carboxi-terminal. En los mamíferos existen dos tipos de cadenas livianas, lambda y kappa. Las cadenas de inmunoglobulina comprenden una región variable y una región constante. La región constante está esencialmente conservada dentro de los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas, mientras que la parte variable es muy diversa y representa
15 el reconocimiento del antígeno.

El término “anticuerpo” incluye una inmunoglobulina que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. El término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados
20 y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de cadena pesada (residuos de aminoácidos 118–447 de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU) que comprende dominios CH1, CH2 y CH3, en los que CH1 se conecta típicamente a CH2–CH3 mediante un ligador peptídico (también denominado “bisagra”). Cada cadena ligera está
25 compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de cadena ligera (abreviada en la presente como CL). El término “región” y el término “dominio” se utilizan indistintamente en la presente. Los dominios VH y VL también se pueden subdividir a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas,
30 denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (ver también Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901–917 (1987)). A menos que se indique lo contrario o se contradiga por el contexto, las secuencias CDR dla presente se identifican de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat y se hace

referencia a posiciones de aminoácidos en las regiones constantes de la presente invención está de acuerdo con la numeración EU (Edelman et al., (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63(1):78–85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edit. 1991 NIH Publication No. 91–3242). Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluye diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término “aminoácido correspondiente a la posición...”, tal como se usa en la presente, se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena IgG1 humana, en particular la cadena pesada IgG1. Las posiciones de aminoácidos correspondientes en otras inmunoglobulinas se pueden encontrar por alineamiento con la IgG1 humana. En consecuencia, un aminoácido o segmento de una secuencia que “corresponde” a un aminoácido o segmento de otra secuencia es aquel que se alinea con el otro aminoácido o segmento utilizando un programa estándar de alineamiento de secuencias tal como ALIGN, ClustalW o similar, normalmente con los ajustes predeterminados, y que tiene al menos 50 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de identidad con una cadena pesada IgG1 humana. Se considera bien conocido en la técnica cómo alinear una secuencia o segmento en una secuencia y determinar así la posición correspondiente en una secuencia a una posición de aminoácido de acuerdo con la presente invención.

El término “ligando Fc de IgG” como se usa en la presente se refiere a una molécula, con preferencia un polipéptido, que se une a la región Fc de una inmunoglobulina IgG para formar un complejo de ligando Fc/Fc. Los ligandos Fc incluyen, pero sin limitación, FcγRIs, FcγRIIs, FcγRIIIs, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcγR viral. Los ligandos Fc también incluyen receptores Fc homólogos (FcRH), que son una familia de receptores Fc homólogos a los FcγR (Davis et al., (2002) Immunol. Rev. 190:123–136). Los ligandos Fc de IgG particulares son los receptores FcRn y Fc gamma. Un “ligando Fc”, tal como se utiliza en la presente, puede proceder de cualquier organismo, tal como ratón, ser humano y cynomolgus.

“Receptor Fc gamma”, “FcγR” o “FcγgammaR” se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de IgG y está codificado por un gen FcγR. En

los seres humanos, esta familia incluye pero no se limita a FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIb-NA1 y FcγRIIb-NA2) (Jefferis et al. , (2002) Immunol. Lett. 82:57-65). Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, que incluye, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen, pero sin limitación, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2).

“FcRn” o “Receptor Fc neonatal”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que se une a la región Fc de IgG y está codificada, al menos en parte, por un gen FcRn. El FcRn puede proceder de cualquier organismo, que incluye, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. La proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, a menudo denominados cadena pesada (codificada por el gen FcRn) y cadena ligera (beta-2-microglobulina). A menos que se especifique lo contrario, “FcRn” o “proteína FcRn” se refiere al complejo de la cadena pesada FcRn con la beta-2-microglobulina. Una “variante de FcRn”, tal como se utiliza en la presente, es aquella que aumenta la unión al receptor FcRn y también puede aumentar la vida media sérica.

“Fc” o “región Fc” o “dominio Fc”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende los dominios CH2 y CH3 de una molécula IgG y, opcionalmente, un ligador peptídico, que incluye toda o parte de la bisagra. Los dominios CH2-CH3 de la IgG1 humana comprenden las posiciones de aminoácidos 231-447, y la bisagra comprende 216-230, de acuerdo con la numeración de EU. Así, con referencia a la IgG, el término “dominio Fc”, tal como se utiliza en la presente, incluye las posiciones de aminoácidos 231-447 (CH2-CH3) y 216-447 (bisagra-CH2-CH3) de acuerdo con la numeración EU, y sus variantes funcionales, que incluye sus fragmentos funcionales. Un “fragmento Fc” puede contener menos aminoácidos, por ejemplo, una variante de truncamiento N-terminal o C-terminal, pero aún conserva la capacidad de formar un dímero con otro dominio Fc o fragmento Fc, como se puede detectar usando métodos estándares, por ejemplo, sobre la base del tamaño (por ejemplo, cromatografía no desnaturizante, cromatografía de exclusión por tamaño, etc.), y por lo tanto es una variante funcional. De acuerdo con la presente invención, un dominio Fc de IgG es con preferencia un dominio Fc de IgG humana que incluye el dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

Los términos “bisagra”, “región bisagra”, “región bisagra del anticuerpo” o “dominio bisagra” como se usa en la presente se refieren al ligador peptídico que comprende los aminoácidos entre CH1 y CH2 de una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG. Estructuralmente, en las moléculas naturales de IgG, por ejemplo, IgG1, el CH1 termina en la posición de aminoácido 215 de acuerdo con la numeración EU, y el CH2 comienza en la posición de aminoácido 231 de acuerdo con la numeración EU. Así, para la IgG, la bisagra incluye las posiciones de aminoácidos 216 a 230 de acuerdo con la numeración EU.

Una “variantes del dominio Fc” contiene modificaciones de aminoácidos en comparación con un dominio Fc original. Así, una “variantes del dominio Fc de IgG1”, por ejemplo, variante del dominio Fc de IgG1 humana, contiene modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones y/o supresiones de aminoácidos) en posiciones correspondientes a posiciones de un dominio Fc de IgG1, por ejemplo, dominio Fc de IgG1 humano, y con preferencia es una variante funcional del dominio Fc original. Dichas variantes de los dominios Fc de IgG conservan al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con el dominio Fc de IgG humano original correspondiente. Opcionalmente, las variantes de los dominios Fc pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 modificaciones de aminoácidos en comparación con el dominio Fc original. Opcionalmente, las variantes de los dominios Fc pueden tener hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 modificaciones de aminoácidos en comparación con el dominio Fc original. Con preferencia, una variante del dominio Fc conserva la capacidad de formar un dímero con otro dominio Fc, medida mediante técnicas descritas en la presente o conocidas en la técnica, tal como electroforesis en gel no desnaturizante.

Modificaciones de Fc

Los agentes de unión descritos en la presente comprenden tres cadenas polipeptídicas diferentes, en las que dos cadenas polipeptídicas, por ejemplo, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica, comprenden regiones CH2–CH3, con preferencia derivadas de IgG tal como IgG1, en particular IgG1 humana. Dichas primera y segunda cadenas polipeptídicas que comprenden regiones CH2–CH3 son capaces de interactuar, por ejemplo, dimerizarse, de este modo se forma un heterodímero que comprende dicha primera y segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente.

Con preferencia, las regiones CH2–CH3 de los agentes de unión se derivan de IgG1, con más preferencia IgG1 humana, aunque CH2 y CH3 derivadas de otros serotipos se pueden usar como se describe en la presente. Además, como se analiza en la presente, los agentes de unión se autoensamblarán, por ejemplo, dentro de una célula huésped productora. Por ejemplo, se prevé que el CH2 de la primera cadena polipeptídica interactúa con el CH2 de la segunda cadena polipeptídica y/o el CH3 de la primera cadena polipeptídica interactúa con el CH3 de la segunda cadena polipeptídica, de este modo se forma un fragmento Fc. Estos fragmentos Fc pueden comprender una o más modificaciones de aminoácidos o “modificaciones Fc”, como se analiza en la presente con respecto a la IgG1 humana, para promover la interacción entre el CH2 de la primera y segunda cadenas polipeptídicas y/o el CH3 de la primera y segunda cadenas polipeptídicas y/o facilitar la purificación de heteromultímeros, tal como los heterodímeros, que contienen la primera y segunda cadenas polipeptídicas que interactúan entre sí respecto de los homomultímeros que solo contienen un tipo de cadena polipeptídica, y/o conferir otras funcionalidades beneficiosas, como se expone en la presente. Las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente también pueden estar contenidas en dominios CH1, por ejemplo, dentro de la primera y/o segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente. Además, los ligadores peptídicos tales como ligadores peptídicos dentro de los restos de scFv o ligadores peptídicos que conectan dominios adicionales de un agente de unión, por ejemplo, CH1 y scFv, o CH2 y scFv, o CH1 y CH2, pueden comprender una o más modificaciones de aminoácidos como se describe en la presente. Por ejemplo, un ligador peptídico que conecta una región CH2–CH3 a otra región o dominio, tal como VH(CD3), o CH1, puede tener una serina en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 220 de acuerdo con la numeración EU en una IgG1 natural (donde normalmente se puede encontrar una cisteína). El uso de un ligador peptídico que comprende una serina en dicha posición correspondiente a la posición 220 de la IgG1 humana reduce la formación de disulfuro entre las dos cadenas que comprenden las regiones CH2–CH3.

En consecuencia, la formación de los agentes de unión descritos en la presente se basa en el uso de diferentes monómeros (por ejemplo, primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas en la presente) que comprenden CH1, CH2 y/o CH3 que contienen sustituciones de aminoácidos tales como las que “sesgan” la formación de heterodímeros formados por dichos monómeros respecto a los homodímeros descritos en la presente, con preferencia acopladas con “modificaciones de pI” que permiten una purificación sencilla de los heterodímeros separándolos de los homodímeros, y opcionalmente en combinación con

“modificaciones de ablación” y modificaciones de Fc adicionales descritas en la presente. Un experto entenderá que cualquiera de las modificaciones de aminoácidos analizadas en la presente con respecto a los dominios CH1, CH2 y/o CH3 y ligadores peptídicos, por ejemplo, variantes de bisagra, se pueden combinar con otras modificaciones de aminoácidos analizadas en la presente o conocidas en la técnica. Por ejemplo, cualquiera de las modificaciones de sesgo y pl se puede combinar independientemente con ablación, y otras modificaciones de Fc. Una modificación de Fc de acuerdo con la presente invención puede ser una inserción, adición, supresión o sustitución de aminoácidos.

Las modificaciones de Fc analizadas en la presente se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. Por ejemplo, N434S es una modificación Fc con una sustitución de serina en la posición 434 por asparagina en relación con el polipéptido de Fc IgG1 humano original y de acuerdo con la numeración EU. La identidad del aminoácido original puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 434S, es decir, la región CH2–CH3 que comprende dicha modificación Fc comprende una serina en una posición de aminoácido que corresponde dicha posición 434 en IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU.

Modificaciones de pl

Las modificaciones del pl aumentan la diferencia del punto isoeléctrico (pl) entre los monómeros, lo que permite la purificación isoeléctrica de proteínas homo y heteromultiméricas. En general, una modificación del pl aumenta el pl de la cadena polipeptídica (cambio básico) o disminuye el pl de la cadena polipeptídica (cambio ácido).

Como se analiza en la presente, una diferencia de pl de al menos 0,1, por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5, entre dos cadenas polipeptídicas puede permitir la separación por cromatografía de intercambio iónico o isoelectroenfoque, u otros métodos sensibles al punto isoeléctrico conocidos en la técnica. Por lo tanto, la inclusión de modificaciones del pl que alteran el pl de cada una de las cadenas polipeptídicas que interactúan entre sí, por ejemplo, primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas en la presente, de tal manera que cada una de dichas cadenas polipeptídicas tiene un pl diferente y el heteromultímero formado por dichas cadenas polipeptídicas también tiene un pl distinto facilita la purificación isoeléctrica de los agentes de unión que comprenden dicho heteromultímero. Estas sustituciones también

ayudan a determinar y controlar la formación de cualquier homo o heteromultímero contaminante no deseado.

Las modificaciones de pI pueden estar contenidas dentro de una o ambas cadenas de un heteromultímero que comprende regiones constantes de cadena pesada, por ejemplo, primera y segunda cadenas polipeptídicas de un agente de unión descrito en la presente, y dentro de CH1, CH2 y/o CH3 y/o dentro de ligadores peptídicos tales como ligadores que conectan los dominios VH y VL de un resto de scFv. Por ejemplo, las variantes pI pueden estar contenidas en la primera cadena polipeptídica y/o en la segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente para disminuir o prevenir la formación de homomultímeros. Típicamente, cuando están contenidas tanto en la primera como en la segunda cadena polipeptídica, las variantes de pI se utilizarán de manera que el pI de una cadena polipeptídica aumente mientras que el pI de la segunda cadena polipeptídica disminuya. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante el reemplazo de un residuo de aminoácido neutro por un residuo de aminoácido cargado positiva o negativamente, o viceversa, o mediante el cambio de un residuo de aminoácido cargado de carga positiva a negativa o viceversa, como se analiza en la presente. Por consiguiente, En ciertas modalidades de la presente invención, se proporciona un cambio suficiente en el pI en al menos una de las cadenas polipeptídicas de un agente de unión descrito en la presente de manera que los heteromultímeros, por ejemplo, de la primera y segunda cadenas polipeptídicas, se pueden purificarse a partir de homomultímeros. En ciertas modalidades, en la presente invención se utiliza una diferencia de pI de tan solo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 o mayor en unidades de pH. La cantidad de modificaciones de pI que se deben incluir en una o más cadenas polipeptídicas de un agente de unión descrito en la presente para obtener una buena separación dependerá en parte del pI de partida de las cadenas polipeptídicas, el pI de las regiones CH, las regiones del armazón Fv, etc., como comprenderá un experto en la técnica. El cambio en el pI se puede calcular por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, sobre la base de las regiones CH, por ejemplo, utilizando el método descrito por Sillero y Maldonado (Sillero, Maldonado, (2006) Comput. Biol. Med. 36(2):157–166). Alternativamente, se puede comparar el pI de cada cadena polipeptídica. Además, los heteromultímeros se pueden separar en función de su tamaño.

En ciertas modalidades, las modificaciones pI, modificaciones de sesgo, modificaciones Fc adicionales o modificaciones de ablación, etc., no se incluyen en las regiones variables de un agente de unión descrito en la presente.

En ciertas modalidades, las modificaciones de pl se derivan de diferentes isotipos de IgG de tal manera que el pl de la cadena polipeptídica respectiva se cambia sin introducir inmunogenicidad (consultar, U.S. 2014/0370013). Con preferencia, las modificaciones de pl se derivan de isotipos de IgG humanos para disminuir el riesgo de introducir inmunogenicidad.

5 Las modificaciones analizadas en la presente se describen en relación con la IgG1 humana, pero todos los isotipos de IgG se pueden alterar de esta manera, así como los híbridos de isotipo. En el caso de que el dominio constante de la cadena pesada sea de IgG2–4, también se pueden utilizar R133E y R133Q.

10 La IgG1 es un isotipo común para los anticuerpos terapéuticos por diversos motivos, que incluyen alta función efectora. Sin embargo, la región CH de la IgG1 tiene un pl más alto que la de la IgG2. Al introducir residuos derivados de IgG2 en posiciones particulares del esqueleto de IgG1, se reduce o aumenta el pl del monómero resultante y, además, se puede aumentar la vida media sérica. Por ejemplo, la IgG1 humana tiene una glicina (pl aproximadamente 5,97) en la posición 137 de acuerdo con la numeración EU, y la IgG2
15 humana tiene un ácido glutámico (pl aproximadamente 3,22) en la posición correspondiente; la sustitución del residuo de ácido glutámico por un residuo de glicina afectará al pl del polipéptido resultante. Disminuir el pl de la región constante de un anticuerpo también puede aumentar la vida media sérica *in vivo* (ver USSN 13/194,904; Ghetie y Ward, 1997, Immunol Today. 18(12): 592–598). Asimismo, las regiones variables con pl más bajo pueden aumentar
20 la vida media sérica (ver Igawa et al., (2010) PEDS 23(5): 385–392).

En una combinación preferida de modificaciones de pl, una cadena polipeptídica (por ejemplo, la primera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente, por ejemplo que comprende VH(CLDN18.2), CH1, CH2 y CH3) comprende un residuo de ácido aspártico en la posición 208, un residuo de ácido glutámico en la posición 295, un residuo de
25 ácido aspártico en la posición 384, un residuo de ácido glutámico en la posición 418 y un residuo de ácido aspártico en la posición 421 (i.e., N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D con respecto a IgG1 humana) de acuerdo con la numeración EU y otra cadena polipeptídica (por ejemplo, la segunda cadena polipeptídica de dicho agente de unión, por ejemplo que comprende VH(CLDN18.2), CH1, VL(CD3), VH(CD3), CH2 y CH3) comprende un ligador
30 péptido cargado positivamente que conecta VH(CD3) y VL(CD3) (“ligador de scFv”), tal como un ligador polipeptídico que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos (GKPGS)₄ o una variante funcional de la misma.

En las cadenas polipeptídicas que no comprenden un CH1 y, en consecuencia, no incluyen una posición de aminoácido que corresponde a la posición 208 de acuerdo con la numeración EU, se pueden usar las siguientes modificaciones de pl negativas: un residuo de ácido glutámico en la posición 295, un residuo de ácido aspártico en la posición 384, un residuo de ácido glutámico en la posición 418 y un residuo de ácido aspártico en la posición 421 (IgG1 humana: Q295E/N384D/Q418E/N421D) de acuerdo con la numeración EU.

En algunas modalidades, una cadena polipeptídica, por ejemplo, la primera cadena polipeptídica, contiene un conjunto de variantes descritos en la presente y la cadena polipeptídica que interactúa con la misma, por ejemplo, la segunda cadena polipeptídica, comprende un ligador de scFv cargado, tal como un ligador de scFv cargado positivamente de la SEQ ID NO: 2 o una variante funcional de la misma, o un ligador de scFv cargado negativamente.

Modificaciones de sesgo

Las “modificaciones de sesgo” son modificaciones estéricas que facilitan la interacción de las cadenas polipeptídicas que comprenden dichas modificaciones. Una estrategia que hace uso de las modificaciones estéricas se conoce en la técnica como “botones y ojales”, en referencia a la manipulación genética de aminoácidos, en la que se introduce una protuberancia en un primer polipéptido de cadena pesada, típicamente en la región Fc (CH2–CH3), y una cavidad correspondiente en un segundo polipéptido de cadena pesada, normalmente en la región Fc (CH2–CH3), de forma que la protuberancia se puede ubicar en la cavidad en la interfaz de estas dos cadenas pesadas para promover la formación de heterodímeros e impedir la formación de homodímeros (ver USSN 61/596,846, Ridgway et al., (1996) Protein Engineering 9(7):617; Atwell et al., (1997) J. Mol. Biol. 270:26; Patente US N.º 8,216,805). Las “protuberancias” se construyen mediante el reemplazo de pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido de cadena pesada con cadenas laterales más grandes. Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido de cadena pesada mediante el reemplazo de las cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (patente US 5,731,168). Las modificaciones de “botones y ojales” se pueden combinar con enlaces disulfuro para sesgar la formación a la heteromultimerización, por ejemplo, la heterodimerización de dichos primer y segundo polipéptidos de cadena pesada (ver Merchant

et al., (1998) Nature Biotech. 16:677).

Las modificaciones de sesgo útiles incluyen, sin limitación, los siguientes pares de modificaciones dobles, en los que una parte de cada par de modificaciones dobles estará presente en una cadena polipeptídica (por ejemplo, la primera cadena polipeptídica descrita en la presente) del agente de unión descrito en la presente y la segunda parte estará presente en otra cadena polipeptídica (por ejemplo, la segunda cadena polipeptídica descrita en la presente) del agente de unión descrito en la presente: S364K/E357Q : L368D/K370S; L368D/K370S : S364K; L368D/K370S : S364K/E357Q; L368E/K370S : S364K; T411E/K360E/Q362E : D401K; L368D/K370S : S364K/E357L; K370S : S364K/E357Q; T366S/L368A/Y407V: T366W y T366S/L368A/Y407V/Y349C: T366W/S354C de acuerdo con la numeración de la UE y con respecto a la IgG1 humana. Con preferencia, L368D/K370S : S364K/E357Q se utiliza en el agente de unión descrito en la presente.

Las modificaciones de sesgo descritas en la presente también pueden tener efecto sobre el pl (consultar, Gunasekaran et al., (2010) J. Biol. Chem. 285(25):19637), y por lo tanto sobre la purificación, y, en consecuencia, también se pueden considerar variantes.

Modificaciones de ablación

Por “ablación” en la presente se entiende una disminución o eliminación de la actividad. “Ablación de la unión al FcγR” se entiende que una región Fc que comprende una o más modificaciones de ablación tiene más de un 50 % de pérdida de actividad de unión al FcγR en comparación con una región Fc que no contiene las modificaciones específicas. Con preferencia, la región Fc que comprende la una o más modificaciones de ablación tiene más de 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o incluso más pérdida de actividad de unión a FcγR. Con preferencia, la actividad de unión a FcγR de una región Fc que comprende una o más modificaciones de ablación en comparación con una región Fc que no contiene las modificaciones específicas está por debajo del nivel de unión detectable en un ensayo Biacore, SPR o BLI.

Como es sabido, el dominio Fc de la IgG1 humana tiene la mayor unión a los receptores Fcγ, por lo que se pueden utilizar modificaciones de ablación cuando los dominios constantes de un agente de unión se derivan de la IgG1. Alternativamente, o además de las

modificaciones de ablación, las mutaciones en la posición de glicosilación 297 (en general a A o S), por ejemplo pueden suprimir significativamente la unión a FcγRIIIa. Las IgG2 e IgG4 humanas tienen una unión naturalmente inferior a los receptores Fcγ (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537–1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716–3725), por lo que los dominios CH1, CH2 y CH3 derivados de IgG2 o IgG4 se pueden utilizar con o sin modificaciones de ablación en los agentes de unión descritos en la presente. Las modificaciones de aminoácidos que suprimen la unión a FcγR se han descrito, por ejemplo, en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129–1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.; 75(24):12161–12168 (2001).

En consecuencia, la porción Fc de un agente de unión descrito en la presente puede comprender una o más “modificaciones de ablación de FcγR” o “modificaciones de inactivación de Fc (FcKO o KO)”. En ciertas modalidades, es deseable reducir o eliminar la unión del dominio Fc a uno o más o todos los receptores Fcγ (por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, etc.). En algunas modalidades, es deseable eliminar la unión a FcγRIIIa de los agentes de unión que se unen a CD3 de forma monovalente, tal como los agentes de unión descritos en la presente, para eliminar o reducir significativamente la actividad ADCC. Así, en los agentes de unión descritos en la presente, una o más de las cadenas polipeptídicas, por ejemplo, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica, de un agente de unión descrito en la presente comprenden una o más variantes de ablación de FcγR. En modalidades preferidas, la una o más variantes de ablación se seleccionan del grupo que consiste en G236R, S239G, S239K, S239Q, S239R, V266D, S267K, S267R, H268K, E269R, 299R, 299K, K322A, A327G, A327L, A327N, A327Q, L328E, L328R, P329A, P329H, P329K, A330L, A330S/P331S, I332K, I332R, V266D/A327Q, V266D/P329K, S267R/A327Q, S267R/P329K, G236R/L328R, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del, S239K/S267K, 267K/P329K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G, E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G y E233P/L234V/L235A/G236del de acuerdo con la numeración EU y con respecto a la IgG1 humana, en donde “del” representa una supresión de aminoácidos en la posición indicada. Con preferencia, las modificaciones E233P/L234V/L235A/G236del/S267K de acuerdo con la numeración EU y con respecto a la IgG1 humana se utilizan tanto en la primera como en la segunda cadena polipeptídica del agente de unión descrito en la presente. Cabe señalar que las modificaciones de ablación aquí descritas suprimen la unión a FcγR pero en general no la unión a FcRn. Sin embargo, se conocen y se pueden usar técnicas para reducir o aumentar

la unión a FcRn con el fin de reducir o aumentar la vida media sérica del agente de unión (ver, por ejemplo, Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281:23514–24; Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176:346–56; y Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28:157–9).

Por ejemplo, en el agente de unión descrito en la presente, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 y la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, en donde la primera y segunda cadenas polipeptídicas comprenden el conjunto de modificaciones de sesgo L368D/K370S : S364K/E357Q, la primera cadena polipeptídica además comprende el conjunto de modificaciones del pl N208D/Q295E/N384D/Q418E/N421D, y tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica además comprende conjunto de modificaciones de ablación E233P/L234V/L235A/G236del/S267K, por ejemplo en donde la primera cadena polipeptídica comprende VH(CLDN18.2) y CH1 y la segunda cadena polipeptídica comprende scFv(CD3), VH(CLDN18.2) y CH1. Por supuesto, se pueden incluir modificaciones adicionales en las secuencias de aminoácidos de un agente de unión respectivo; por ejemplo, un agente de unión puede comprender modificaciones adicionales de aminoácidos, tales como sustituciones, además de las modificaciones comentadas anteriormente.

Modificaciones Fc adicionales

Además de otras modificaciones descritas en la presente, tales como modificaciones de pl, sesgo y ablación, se pueden utilizar varias modificaciones útiles que alteran la unión de uno o más receptores FcγR, alteran la unión a receptores FcRn, etc.

En consecuencia, hay una serie de sustituciones de aminoácidos útiles que se pueden realizar para alterar la unión de los agentes de unión descritos en la presente a uno o más receptores FcγR. Pueden ser útiles las sustituciones que producen aumento de la unión, así como a una disminución de la unión. Por ejemplo, se sabe que el aumento de la unión a FcγRIIIa produce un aumento de la ADCC. Del mismo modo, la disminución de la unión a FcγRIIb también puede ser beneficiosa. Las sustituciones de aminoácidos que se pueden usar en la presente invención incluyen las enumeradas en los USSNs 11/124,620, 11/174,287, 11/396,495, 11/538,406, todos los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Las sustituciones de aminoácidos particularmente útiles que pueden incorporarse a los

agentes de unión descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a 236A, 239D, 239E, 332E, 332D, 239D/332E, 267D, 267E, 328F, 267E/328F, 236A/332E, 239D/332E/330Y, 239D/332E/330L, 243A, 243L, 264A, 264V y 299T.

Además, hay modificaciones adicionales que son útiles para aumentar la unión a FcRn y aumentar la vida media sérica, como se divulga en USSN 12/341,769, que se incorpora por referencia en su totalidad, que incluyen pero sin limitación 434S, 434A, 428L, 308F, 259I, 428L/434S, 259I/308F, 436I/428L, 436I/434S, 436V/434S, 436V/428L y 259I/308F/428L de acuerdo con la numeración de la UE.

Además, un CH3 en una o ambas cadenas polipeptídicas, con preferencia en ambas cadenas polipeptídicas, forma un heterodímero Fc que puede contener las modificaciones M428L/N434S lo que da como resultado una vida media sérica más larga.

Como apreciarán los expertos en la técnica, las modificaciones que aquí se exponen se pueden combinar independientemente con otras modificaciones. En algunas modalidades, una cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente (por ejemplo, la primera cadena polipeptídica) comprende N208D, Q295E, N384D, Q418E y N481D de acuerdo con la numeración EU, y otra cadena polipeptídica del agente de unión (por ejemplo, la segunda cadena polipeptídica) comprende un ligador de scFv cargado positivamente descrito en la presente. Con preferencia, la primera cadena polipeptídica del agente de unión además comprende K370S y L368D, y la segunda cadena polipeptídica del agente de unión además comprende E357Q y S364K, de acuerdo con la numeración EU. Además, En una modalidad preferida, tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica también comprenden E233P, L234V, L235A, G236del y S267K de acuerdo con la numeración EU. Con máxima preferencia, la primera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende N208D, E233P, L234V, L235A, G236del, S267K, Q295E, L368D, K370S, N384D, Q418E y N481D, y la segunda cadena polipeptídica del agente de unión comprende E233P, L234V, L235A, G236del, S267K, E357Q y S364K y, opcionalmente, C220S para eliminar la cisteína que normalmente se aparea con una cadena ligera.

El término “agente de unión monoclonal”, tal como se utiliza en la presente, incluye un “anticuerpo monoclonal” y se refiere a una preparación de moléculas de agente de unión de composición molecular única.

Un “anticuerpo monoclonal” muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

El término “agente de unión recombinante”, tal como se utiliza en la presente, incluye un “anticuerpo recombinante” e incluye todos los agentes de unión que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes.

El término “agente de unión humano”, tal como se utiliza en la presente, incluye un “anticuerpo humano” y pretende incluir agentes de unión que tengan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los agentes de unión humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término “agente de unión humanizado”, tal como se usa en la presente, incluye un “anticuerpo humanizado” y se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a un antígeno que deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. Esto se puede obtener, por ejemplo, mediante el injerto de las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos no humanos, que juntas forman el sitio de unión al antígeno, en una región estructural aceptora (FR) humana homóloga (ver los documentos WO92/22653 y EP0629240). El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con dominios constantes o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en regiones estructurales apropiadas en los dominios variables. Para reconstituir completamente la afinidad y especificidad de unión del agente de unión original, puede ser necesaria la sustitución de residuos estructurales del agente de unión original (es decir, el agente de unión no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino) en las regiones estructurales humanas (retro-mutaciones). El modelado de homología estructural puede ayudar a identificar los residuos de aminoácidos en las regiones estructurales que son importantes para las propiedades de unión del agente de unión. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de agentes de unión humanizados conservan

todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR alteradas con respecto al agente de unión original, por ejemplo, el anticuerpo. Así, un agente de unión humanizado puede comprender secuencias de CDR no humanas, regiones estructurales principalmente humanas que comprenden opcionalmente una o más retromutaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos no humana, y regiones constantes totalmente humanas.

El término “agente de unión quimérico”, tal como se usa en la presente, incluye un “anticuerpo quimérico” y se refiere a aquellos agentes de unión en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y liviana es homóloga a secuencias correspondientes en agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos, derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otra. Típicamente, la región variable de las cadenas livianas y pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable se puede derivar convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones celulares humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de la facilidad de preparación y la especificidad no es afectada por la fuente, la región constante humana, es menos probable que provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los agentes de unión que lo que haría la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los agentes de unión o fragmentos de los mismos, por ejemplo, regiones variables y/o constantes, se pueden derivar de diferentes especies, que incluyen pero sin limitación ratón, rata, conejo, cobayo y ser humano.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen IgA tal como IgA1 o IgA2, IgG1 (incluidos los alotipos con polimorfismos en la posición de aminoácido 356 (D o E) y 358 (L o M) de acuerdo con la numeración de la UE), anticuerpos IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM e IgD. En diversas modalidades, la inmunoglobulina es un anticuerpo IgG1, más particularmente un

isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda (es decir, IgG1, κ , λ), un anticuerpo IgG2a (por ej. por ejemplo IgG2a, κ , λ), un anticuerpo IgG2b (por ejemplo IgG2b, κ , λ), un anticuerpo IgG3 (por ejemplo IgG3, κ , λ) o un anticuerpo IgG4 (por ejemplo IgG4, κ , λ). Las secuencias de aminoácidos descritas en la presente con respecto al alotipo 356D/358M de IgG1 también incluyen el alotipo 356E/358L.

El término “modificación de la subclase IgG” o “modificación del isotipo” significa una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo IgG en el aminoácido correspondiente de un isotipo IgG diferente y alineado. Por ejemplo, debido a que la IgG1 comprende una tirosina y la IgG2 una fenilalanina en la posición 296 del aminoácido de acuerdo con la numeración EU, una sustitución F296Y en la IgG2 se considera una modificación de la subclase IgG.

Como se usa en la presente, un “agente de unión heterólogo” incluye un “anticuerpo heterólogo” y se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho agente de unión. Este término se refiere a un agente de unión que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificadora correspondiente a la que se encuentra en un organismo que no consiste en el organismo transgénico, y que se deriva en general de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se usa en la presente, un “agente de unión heterohíbrido” incluye un “anticuerpo heterohíbrido” y se refiere a un agente de unión que tiene cadenas livianas y pesadas de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

Los agentes de unión, incluidos los anticuerpos descritos en la presente, se aíslan con preferencia. “Aislado”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un agente de unión que está sustancialmente libre de otros agentes que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un agente de unión aislado que se une específicamente a CLDN18.2 y CD3 está sustancialmente libre de agentes de unión que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN18.2 y CD3). Sin embargo, un agente de unión aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN18.2 humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de la especie CLDN18.2). Además, un agente de unión aislado puede estar sustancialmente libre

de otro material celular y/o sustancias químicas.

Los términos “porción de unión a antígeno” de un agente de unión tal como un anticuerpo (o simplemente “porción de unión”) o “fragmento de unión a antígeno” de un agente de unión tal como un anticuerpo (o simplemente “fragmento de unión”) o términos similares se refieren a uno o más fragmentos de un agente de unión que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un agente de unión como un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fab', derivados de un fragmento $F(ab')_2$ y que contienen un grupo sulfhidrilo libre que puede ser alquilado o utilizado en conjugación con una enzima, toxina u otra proteína de interés, en donde el Fab' puede contener una pequeña porción de Fc; (iv) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (v) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (vi) fragmentos dAb (Ward et al. , (1989) Nature 341: 544–546), que consisten en un dominio VH; (vii) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas, y (viii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un ligador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite obtenerlos como una cadena proteica única en la que los dominios VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423–426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879–5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se incluyen en el término “fragmento de unión a antígeno” de un agente de unión, tal como un anticuerpo. Otro ejemplo son las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante

técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Un fragmento variable de cadena simple (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y liviana (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido ligador corto de usualmente diez a aproximadamente 30 aminoácidos, tales como un ligador scFv, por ejemplo, el representado por SEQ ID NO: 2. El ligador normalmente es rico en glicina para flexibilidad, así como en serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el extremo N-terminal de la VH con el extremo C-terminal de la VL, o viceversa. Los fragmentos variables de cadena simple divalentes (o bivalentes) (di-scFvs, bi-scFvs) se pueden manipular genéticamente mediante la unión de dos scFvs. Esto se puede hacer mediante la producción de una cadena peptídica simple con dos dominios VH y dos VL, lo que produce scFvs en tándem. La invención también incluye moléculas multiespecíficas que comprenden más de un dominio de unión scFvs. Un péptido ligador flexible común es $G_4S)_x$, donde x puede ser 2, 3, 4, 5 o 6. Con preferencia, un ligador que conecta el dominio VH y VL de un scFv comprende, con preferencia consiste en, la secuencia de aminoácidos $(GKPGS)_x$ o una variante funcional de la misma, donde x puede ser 2, 3, 4, 5 o 6. Opcionalmente, la asociación de VH y VL se puede estabilizar mediante uno o más enlaces disulfuro intermoleculares.

Los fragmentos Fab (fragmento de unión a antígeno) de anticuerpos son polipéptidos inmunorreactivos que comprenden dominios de unión a antígeno monovalentes de un anticuerpo compuesto por un polipéptido que consiste en una región variable de cadena pesada (VH) y una porción de región constante de cadena pesada 1 (CH1) y un polipéptido que consiste en una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (en la que las porciones CL y CH1 están unidas entre sí, por ejemplo mediante un enlace disulfuro entre residuos de Cys). Con preferencia, en los fragmentos Fab descritos en la presente, CH1 y CL son de origen humano. En algunas modalidades, CL es CL de tipo kappa. En algunas modalidades, CH1 se deriva de IgG1, con preferencia de IgG1 humana.

El término “anticuerpo” abarca todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos, tales como los fragmentos de anticuerpos, descritos en la presente a efectos de la invención. El término “derivados de anticuerpos” se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo, o un fragmento de

anticuerpo. Además, los anticuerpos y derivados de anticuerpos descritos en la presente son útiles para producir los agentes de unión descritos en la presente.

Los anticuerpos naturales son en general monoespecíficos, es decir, se unen a un antígeno único. Los agentes de unión biespecíficos descritos en la presente se unen a una
5 célula citotóxica tal como una célula T (mediante el acoplamiento del receptor CD3) y a una célula diana tal como una célula cancerosa (mediante el acoplamiento de CLDN18.2). Los agentes de unión descritos en la presente se unen al menos a dos tipos diferentes de antígeno y son al menos biespecíficos o multiespecíficos, tales como triespecíficos, tetraespecíficos, etcétera.

10 En algunas modalidades, un agente de unión descrito en la presente es al menos trivalente. Como se utiliza en la presente, “valente”, “valencia”, “valencias”, u otras variaciones gramaticales de los mismos, significan el número de sitios de unión a antígeno o dominios de unión en un agente de unión. Los sitios de unión a antígeno que se unen al mismo antígeno pueden reconocer diferentes epítomos o con preferencia el mismo epítomo. Un agente de unión
15 descrito en la presente también puede tener valencias de 4 o superiores.

Un agente de unión descrito en la presente es con preferencia una proteína artificial (incluidos complejos proteicos) que puede estar compuesta por fragmentos de al menos dos anticuerpos diferentes (dichos fragmentos de al menos dos anticuerpos diferentes forman al menos dos dominios de unión diferentes) y, en consecuencia, se une a al menos dos tipos
20 diferentes de antígeno. Un agente de unión descrito en la presente está manipulado genéticamente para unirse simultáneamente a una célula inmunitaria, tal como una célula efectora inmunitaria, en particular una célula T tal como una célula citotóxica (por ejemplo, mediante la unión a CD3) y una célula diana como una célula cancerosa (mediante la unión al antígeno asociado al tumor CLDN18.2) para ser destruida.

25 En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente tiene el formato de un constructo de Fab2–scFv, es decir un constructo que comprende dos fragmentos Fab (cada uno de los cuales comprende dominios VH y CH1 en una cadena polipeptídica y dominios VL y CL correspondientes en otra cadena polipeptídica, en donde se forma un dominio de unión a antígeno por interacción de cada uno de dicho conjunto de cadenas
30 polipeptídicas) y un resto de scFv (que comprende dominios VH y VL conectados entre sí por

un ligador polipeptídico en la misma cadena polipeptídica, en donde VH y el VL interactúan para formar un dominio de unión a antígeno). En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente es un tetrámero compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas, en el que la primera cadena polipeptídica comprende una VH derivada de una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina con una primera especificidad, el segundo polipéptido comprende una VH derivado de una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina con una primera especificidad, y un resto scFv que comprende una VH derivada de una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina con una segunda especificidad, y una VL derivada de una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina con una segunda especificidad, la tercera cadena polipeptídica comprende una VL derivada de una inmunoglobulina, por ejemplo, una inmunoglobulina con a primera especificidad, y la cuarta cadena polipeptídica es idéntica con la tercera cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas polipeptídicas además comprenden una CH1 derivada de una inmunoglobulina, por ejemplo, C-terminal a la VH derivada de una inmunoglobulina con una primera especificidad, y la tercera y cuarta cadenas polipeptídicas además comprenden una CL derivada de una inmunoglobulina. En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas polipeptídicas además comprenden dominios de CH2 y CH3 (CH2-CH3) derivados de una inmunoglobulina, por ejemplo, C-terminal al fragmento Fab y resto scFv, respectivamente. En consecuencia, En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente comprende una primera cadena polipeptídica que comprende VH-CH1 conectada a CH2-CH3, una segunda cadena polipeptídica que comprende VH-CH1 conectada a un resto scFv conectada a CH2-CH3, y tercera y cuarta cadenas polipeptídicas, cada una que comprende VL-CL. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica interactúa con la segunda cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica interactúa con la tercera cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica interactúa con la cuarta cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas polipeptídicas interactúan, la primera cadena polipeptídica además interactúa con la tercera cadena polipeptídica, y la segunda cadena polipeptídica además interactúa con la cuarta cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la CH2 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CH2 de la segunda cadena polipeptídica y/o la CH3 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CH3 de la segunda cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la VH de la primera cadena polipeptídica interactúa con la VL de la tercera cadena polipeptídica para formar un dominio de unión y/o la CH1 de la primera cadena polipeptídica interactúa con la CL de la tercera cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la VH de la segunda cadena polipeptídica (que no es parte del resto scFv) interactúa con la

VL de la cuarta cadena polipeptídica para formar un dominio de unión y/o la CH1 de la segunda cadena polipeptídica interactúa con la CL de la cuarta cadena polipeptídica. En algunas modalidades, se forma un puente disulfuro entre un residuo de cisteína en CL y un residuo de cisteína en CH1. Una o ambas cadenas polipeptídicas que comprenden CH2–CH3 pueden comprender una o más modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, modificaciones de Fc, descritas en la presente, tales como modificaciones de PI, sesgo, Fc adicional y de ablación, por ejemplo, para promover la interacción de la cadena polipeptídica. De acuerdo con la invención, la VH y la VL del resto scFv se conectan con preferencia mediante un ligador peptídico (“ligador scFv”). En algunas modalidades, la CH1 de la primera y/o segunda cadena polipeptídica está conectada a la CH2 de la misma cadena polipeptídica mediante un ligador peptídico. En algunas modalidades, el scFv está conectado a CH2 mediante un ligador peptídico.

En algunas modalidades, la VH de la primera cadena polipeptídica y la VL de la tercera cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, la VH adicional de la segunda cadena polipeptídica que no es parte del scFv y la VL de la cuarta cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, y la VH y VL del scFv de la segunda cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CD3.

El término “ligador” se refiere a cualquier medio que sirve para unir dos unidades funcionales distintas (por ejemplo, dominios o regiones de una cadena polipeptídica). Los tipos de ligadores incluyen, pero sin limitación, ligadores químicos y ligadores peptídicos y polipeptídicos. Las secuencias de los ligadores peptídicos y polipeptídicos no están limitadas. Los ligadores peptídicos son con preferencia no inmunogénicos y flexibles, tales como los que comprenden secuencias de serina y glicina. De acuerdo con el constructo particular, los ligadores pueden ser largos o cortos.

En modalidades preferidas, el ligador scFv, es decir, el ligador que conecta VH y VL que forman el resto scFv, con preferencia comprende, y con preferencia consiste en, un ligador peptídico flexible como se describe en la presente, con preferencia la secuencia de aminoácidos (GKPGS)_x o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6. En una modalidad incluso más preferida, el ligador scFv comprende, y con preferencia consiste en, la secuencia de aminoácidos (GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 2) o una variante funcional de la

misma. Con preferencia, el resto scFv está conectado a CH2 de la segunda cadena polipeptídica mediante un ligador peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₂KTHTCPPC (SEQ ID NO: 4) o una variante funcional de la misma.

De acuerdo con la invención, un ligador que conecta un scFv y una CH1, con preferencia en el extremo C-terminal de la CH1, con preferencia comprende, con preferencia consiste en, la secuencia de aminoácidos (G₄S)_x o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6, con preferencia (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 5) o una variante funcional de la misma. De acuerdo con la invención, un ligador que conecta CH2 y scFv, con preferencia en el extremo N-terminal de CH2, con preferencia comprende, y con preferencia consiste en, la secuencia de aminoácidos (G₄S)₂KTHTCPPC (SEQ ID NO: 4) o una de sus variantes. De acuerdo con la invención, un ligador que conecta CH1 y CH2 con preferencia comprende, y con preferencia consiste en, la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 6) o una variante funcional de la misma. De acuerdo con la invención, CH1 y scFv, por ejemplo, de la segunda cadena polipeptídica, se conectan mediante un ligador peptídico con preferencia que comprende, con preferencia que consiste en, la secuencia de aminoácidos (G₄S)₂ (SEQ ID NO: 5) o una variante funcional de la misma. Sin embargo, también se pueden usar otros ligadores conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente comprende una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica, en donde

i) la primera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal los siguientes dominios:

VH(CLDN18.2)–CH1–CH2–CH3,

ii) la segunda cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal los siguientes dominios:

VH(CLDN18.2)–CH1–VL(CD3)–VH(CD3)–CH2–CH3,

iii) la tercera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-

terminal los siguientes dominios:

VL(CLDN18.2)–CL, y

iv) la cuarta cadena polipeptídica es idéntica a la tercera cadena polipeptídica,

con preferencia en donde VH(CLDN18.2) de la primera cadena polipeptídica y
5 VL(CLDN18.2) de la tercera cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión
para CLDN18.2, VH(CLDN18.2) de la segunda cadena polipeptídica y VL(CLDN18.2) de la
cuarta cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2,
VH(CD3) y VL(CD3) interactúan para formar un dominio de unión para CD3, y los dominios
de las cadenas polipeptídicas con preferencia están conectados entre sí mediante ligadores
10 peptídicos como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente comprende: a)
una primera cadena polipeptídica que comprende una VH(CLDN18.2), y CH1, CH2 y CH3 que
comprende un residuo de ácido aspártico en la posición 208, un residuo de prolina en la
posición 233, un residuo de valina en la posición 234, un residuo de alanina en la posición
15 235, una supresión en la posición 236, un residuo de lisina en la posición 267, un residuo de
ácido glutámico en la posición 295, un residuo de ácido aspártico en la posición 368, un
residuo de serina en la posición 370, un residuo de ácido aspártico en la posición 384, un
residuo de ácido glutámico en la posición 418 y un residuo de ácido aspártico en la posición
421 de acuerdo con la numeración EU; b) una segunda cadena polipeptídica que comprende
20 una VH(CLDN18.2) y una CH1 como se describe en la presente, VH(CD3) y VL(CD3) que se
conectan entre sí a través de un ligador de scFv cargado con la secuencia de aminoácidos
(GKPGS)₄ (SEQ ID NO: 2) y CH2 y CH3 que comprende un residuo de prolina en la posición
233, un residuo de valina en la posición 234, un residuo de alanina en la posición 235, una
supresión en la posición 236, un residuo de lisina en la posición 267, a residuo de glutamina
25 en la posición 357 y un residuo de lisina en la posición 364 de acuerdo con la numeración EU;
c) una tercera cadena polipeptídica que comprende VL(CLDN18.2) y CL y d) una cuarta
cadena polipeptídica idéntica a la tercera cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente comprende una
primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica, en donde

i) la primera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal:

VH(CLDN18.2)–CH1–ligador–CH2–CH3,

5 ii) la segunda cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal:

VH(CLDN18.2)–CH1–ligador–VL(CD3)–ligador–VH(CD3)–ligador–CH2–CH3,

iii) la tercera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal los siguientes dominios:

VL(CLDN18.2)–CL, y

10 iv) la cuarta cadena polipeptídica es idéntica a la tercera cadena polipeptídica,

con preferencia en donde VH(CLDN18.2) de la primera cadena polipeptídica y VL(CLDN18.2) de la tercera cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, VH(CLDN18.2) de la segunda cadena polipeptídica y VL(CLDN18.2) de la cuarta cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, y
15 VH(CD3) y VL(CD3) interactúan para formar un dominio de unión para CD3.

En algunas modalidades, el agente de unión descrito en la presente comprende una primera, una segunda, una tercera y una cuarta cadena polipeptídica, en donde

i) la primera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-terminal:

20 VH(CLDN18.2)–CH1–ligador1–CH2–CH3,

ii) la segunda cadena polipeptídica comprende desde el extremo N-terminal al C-

terminal:

VH(CLDN18.2)–CH1–ligador2–VL(CD3)–ligador3–VH(CD3)–ligador4–CH2–CH3,

iii) la tercera cadena polipeptídica comprende desde el extremo N–terminal al C–terminal:

5 VL(CLDN18.2)–CL, y

iv) la cuarta cadena polipeptídica es idéntica a la tercera cadena polipeptídica,

en donde ligador1 comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTHTCPPCP o una variante funcional de la misma, ligador2 comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)_x o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6, con preferencia en donde
10 x es 2, ligador3 comprende la secuencia de aminoácidos (GKPGS)_x o una variante funcional de la misma, en donde x es 2, 3, 4, 5 o 6, con preferencia en donde x es 4, y ligador4 comprende la secuencia de aminoácidos (G₄S)₂KTHTCPPCP o una variante funcional de la misma, y

con preferencia en donde VH(CLDN18.2) de la primera cadena polipeptídica y
15 VL(CLDN18.2) de la tercera cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, VH(CLDN18.2) de la segunda cadena polipeptídica y VL(CLDN18.2) de la cuarta cadena polipeptídica interactúan para formar un dominio de unión para CLDN18.2, y VH(CD3) y VL(CD3) interactúan para formar un dominio de unión para CD3.

Los agentes de unión descritos en la presente, y/o la primera, segunda, tercera y cuarta
20 cadenas polipeptídicas de dichos agentes de unión descritos en la presente, también pueden comprender una secuencia de aminoácidos para facilitar la secreción del agente de unión o de la cadena polipeptídica, tal como una señal de secreción N–terminal, y/o una o más etiquetas epitópicas que faciliten la unión, purificación o detección de la molécula. Con preferencia, la señal de secreción es una secuencia señal que permite un paso suficiente a
25 través de la vía secretora y/o la secreción del agente de unión o las cadenas polipeptídicas del mismo al ambiente extracelular. Con preferencia, la secuencia de señal de secreción es

escindible y se elimina del agente de unión maduro o la cadena polipeptídica. La secuencia señal de secreción se elige con preferencia con respecto a la célula u organismo en el que se produce el agente de unión o la cadena polipeptídica.

La secuencia de aminoácidos de una etiqueta epitópica se puede introducir en cualquier posición dentro de la secuencia de aminoácidos del agente de unión o la cadena polipeptídica, y puede adoptar la forma de un bucle dentro de la estructura proteica codificada, o se puede fusionar en forma N-terminal o C-terminal al agente de unión o a la cadena polipeptídica. Con preferencia, la etiqueta epitópica está fusionada de forma C-terminal al agente de unión o a la cadena polipeptídica. La etiqueta epitópica puede contener un sitio de escisión que permita separar la etiqueta del agente de unión o la cadena polipeptídica. Dicha etiqueta epitópica puede ser cualquier tipo de etiqueta epitópica que sea funcional en condiciones nativas y/o desnaturalizantes, con preferencia una etiqueta de histidina, con más preferencia una etiqueta que comprende seis histidinas.

El agente de unión aquí descrito puede contener, además de dichos primer, segundo y tercer dominios de unión, uno o más dominios de unión adicionales que sirven, por ejemplo, para aumentar la selectividad para células tumorales. Esto se puede lograr, por ejemplo, al proporcionar dominios de unión que se unan a otros antígenos expresados en las células tumorales.

El término “modificación postraducciona” o términos similares se refieren a las modificaciones de una proteína, tal como las modificaciones covalentes y enzimáticas, que se producen después de la biosíntesis de la proteína. Como es comúnmente conocido en la técnica, los agentes de unión, tales como los anticuerpos que se expresan en las células, a menudo se modifican después de la traducción. Por ejemplo, las modificaciones postraduccionales de los agentes de unión, tal como los anticuerpos, se pueden producir en las cadenas laterales de aminoácidos o en los extremos N o C-terminales de las cadenas pesadas o livianas, por ejemplo, de la primera y/o la segunda cadena polipeptídica descritas en la presente. Los ejemplos de modificaciones postraduccionales que se pueden producir en los agentes de unión descritos en la presente incluyen, sin limitación, la escisión de lisina en el extremo C-terminal de una cadena pesada, por ejemplo, de la primera y/o segunda cadena polipeptídica, por ejemplo, por una carboxipeptidasa; la modificación de glutamina o ácido glutámico en el extremo N-terminal de una cadena pesada, por ejemplo, de la primera y/o

segunda cadena polipeptídica, a ácido piroglutámico por piroglutamilación; modificación de glutamina o ácido glutámico en el extremo N-terminal de una cadena ligera, por ejemplo, de la tercera y/o cuarta cadena polipeptídica, a ácido piroglutámico por piroglutamilación; glucosilación; oxidación; desamidación; y glicación. Se sabe que tales modificaciones postraduccionales se producen en diversos agentes de unión (Liu et al., 2008, J. Pharmacol. Sci. 97(7):2426–2447). Las modificaciones postraduccionales debidas a la piroglutamilación en el extremo N-terminal y la supresión de lisina en el extremo C-terminal normalmente no influyen en la actividad de los agentes de unión (Lyubarskaya et al., 2006, Analyt. Biochem. 348(1):24–39).

En consecuencia, en algunas modalidades, un agente de unión descrito en la presente puede comprender una o más modificaciones postraduccionales. En algunas modalidades, la una o más modificaciones postraduccionales comprenden piroglutamilación en el extremo N-terminal de una o más cadenas polipeptídicas del agente de unión. En algunas modalidades, la una o más modificaciones postraduccionales comprenden la piroglutamilación en el extremo N-terminal de una o más VH(CLDN18.2). En algunas modalidades, la una o más modificaciones postraduccionales comprenden la supresión de lisina en el extremo C-terminal de la primera cadena polipeptídica. En algunas modalidades, la una o más modificaciones postraduccionales comprenden la supresión de lisina en el extremo C-terminal de la segunda cadena polipeptídica.

En el contexto de la presente invención, los agentes de unión descritos en la presente son con preferencia capaces de provocar una o más funciones efectoras inmunitarias como se describe en la presente. Con preferencia, dichas funciones efectoras inmunitarias se dirigen contra células que portan el antígeno asociado al cáncer CLDN18.2 en su superficie.

El término “funciones efectoras inmunitarias” en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por componentes del sistema inmunitario que tenga como resultado, por ejemplo, la inhibición del crecimiento del cáncer y/o inhibición del desarrollo del cáncer, que incluye la inhibición de la diseminación y metástasis del cáncer. Con preferencia, las funciones efectoras inmunitarias provocan la destrucción de las células cancerosas. Las funciones efectoras inmunitarias comprenden citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP), inducción de apoptosis en las

células portadoras del antígeno asociado al cáncer, citólisis de las células portadoras del antígeno asociado al cáncer y/o inhibición de la proliferación de las células portadoras del antígeno asociado al cáncer. Los agentes de unión descritos en la presente son con preferencia capaces de reclutar y redirigir células T, tales como células T CD4 y/o CD8, en particular células T CD107a+, hacia células asociadas a la enfermedad, tales como células cancerosas y, de este modo, actúan mediante citotoxicidad de células T redirigida (RTCC), es decir, las células T después de la redirección destruyen con preferencia las células asociadas a la enfermedad, por ejemplo, células cancerosas. Se sabe que la expresión de CD107a está asociada con el potencial citolítico de las células T CD4 y CD8. Con preferencia, dichas células T CD107a+ son capaces de degranular, es decir, son capaces de liberar moléculas citotóxicas tales como perforinas, granzimas, etc., y también pueden liberar citoquinas tal como una o más del factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleuquina-2 (IL2), Interferón γ (IFN γ), etc., de este modo provocan la muerte de las células diana, por ejemplo, células cancerosas a las que las células T son redirigidas por los agentes de unión descritos en la presente. Los agentes de unión también pueden ejercer un efecto simplemente mediante la unión a antígenos asociados al cáncer en la superficie de una célula cancerosa. Por ejemplo, los agentes de unión pueden bloquear la función del antígeno asociado al cáncer o inducir la apoptosis simplemente mediante la unión al antígeno asociado al cáncer en la superficie de una célula cancerosa.

El término “célula efectora inmunitaria” o “célula efectora” en el contexto de la presente invención se refiere a una célula que ejerce funciones efectoras durante una reacción inmunitaria. Por ejemplo, las células efectoras inmunitarias comprenden células T (células T citotóxicas, células T auxiliares, células T infiltrantes de tumores), células B, células citolíticas naturales, neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. Los términos “célula T” y “linfocito T” se utilizan indistintamente en la presente e incluyen células T auxiliares (células T CD4+) y células T citotóxicas (CTL, células T CD8+) que comprenden células T citolíticas. El término “célula T dependiente del MHC” o términos similares se refieren a una célula T que reconoce un antígeno cuando se presenta en el contexto del MHC y, con preferencia, ejerce funciones efectoras de las células T, por ejemplo, la destrucción de las células diana que expresan un antígeno.

Las células T pertenecen a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos y desempeñan un papel fundamental en la inmunidad medida por células. Se distinguen de otros tipos de linfocitos, tal como los linfocitos B y las células citolíticas naturales, por la

presencia de un receptor especial en su superficie celular denominado receptor de células T (TCR). El timo es el principal órgano responsable de la maduración de las células T. Se han descubierto varios subconjuntos diferentes de células T, cada uno con una función distinta.

5 Las células T auxiliares asisten a otros leucocitos en los procesos inmunológicos, que incluyen la maduración de las células B en células plasmáticas y la activación de células T citotóxicas y macrófagos, entre otras funciones. Estas células también se conocen como células T CD4+ porque expresan la glicoproteína CD4 en su superficie. Las células T auxiliares normalmente se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos mediante moléculas de MHC de clase II que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Una vez activadas, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas denominadas citoquinas que regulan o asisten en la respuesta inmunitaria activa.

15 Las células T citotóxicas destruyen las células infectadas por virus y las células cancerosas, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Estas células también se conocen como células T CD8+, ya que expresan la glicoproteína CD8 en su superficie. Estas células normalmente reconocen sus dianas mediante la unión al antígeno asociado a MHC de clase I, que está presente en la superficie de casi todas las células del cuerpo.

Todas las células T tienen un receptor de células T (TCR) que existe como un complejo de varias proteínas. El TCR de una célula T es capaz de interactuar con péptidos inmunogénicos (epítomos) unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y presentados en la superficie de las células diana. La unión específica del TCR desencadena una cascada de señales en el interior de la célula T que conduce a la proliferación y diferenciación en una célula T efectora madura. En la mayoría de las células T, el receptor de células T real está compuesto por dos cadenas peptídicas separadas, que se producen a partir de los genes independientes de los receptores de células T alfa y beta (TCR α y TCR β) y se denominan cadenas α - y β -TCR. Un grupo de células T mucho menos común (2 % de células T totales), las células T $\gamma\delta$ (células T gamma delta) poseen un receptor de células T (TCR) distinto en su superficie, que se compone de una cadena γ y una cadena δ .

Todas las células T se originan a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Los progenitores hematopoyéticos derivados de células madre hematopoyéticas pueblan el timo y se expanden por división celular para generar una gran población de

timocitos inmaduros. Los timocitos más tempranos no expresan ni CD4 ni CD8, por lo que se clasifican como células doblemente negativas (CD4–CD8–). A medida que avanzan en su desarrollo, se convierten en timocitos doblemente positivos (CD4+CD8+) y, finalmente, maduran hasta convertirse en timocitos positivos únicos (CD4+CD8– o CD4–CD8+) que se liberan del timo a los tejidos periféricos.

Como se usa en la presente, el término “célula NK” o “célula citolítica natural” se refiere a un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de células T.

En los seres humanos, las moléculas MHC se denominan normalmente moléculas HLA (antígeno leucocitario humano). Existen dos clases principales de moléculas MHC: clase I y clase II. Los antígenos MHC de clase I se encuentran en casi todas las células nucleadas del cuerpo. La función principal de esta clase de moléculas MHC es mostrar (o presentar) fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares a los CTL. Sobre la base de esta presentación, los CTL atacarán a aquellos que presenten péptidos unidos al MHC, incluidos los péptidos asociados a enfermedades (antígenos), tales como los antígenos del cáncer. Las células T CD8 positivas normalmente son citotóxicas (por lo que se denominan células T citotóxicas = CTL), reconocen péptidos de 9 a 10 aminoácidos que se procesan en forma intracelular a partir de proteínas de cualquier localización subcelular y que se presentan en la superficie celular mediante moléculas MHC de clase I. En consecuencia, la expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I desempeña un papel crucial en la determinación de la susceptibilidad de las células diana a los CTL.

Los agentes de unión descritos en la presente se pueden conjugar con un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células y, en particular, las mata. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1–dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6–mercaptopurina, 6–tioguanina, citarabina, fludarabina, 5–

fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorrubicina),
5 antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC), y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una modalidad preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra modalidad, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad preferida, el agente terapéutico es doxorrubicina,
10 cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

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

Son bien conocidas las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico con los agentes de unión, ver, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs
15 In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985);
20 "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada.
25

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

El término "reordenado". como se usa en la presente se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en la que un segmento V se

ubica inmediatamente adyacente a un segmento D–J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Un locus del gen de la inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado se puede identificar por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

El término “no reordenado” o “configuración de línea germinal”, tal como se utiliza en la presente en referencia a un segmento V, se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

En algunas modalidades, un agente de unión descrito en la presente tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2, es decir, la capacidad de unirse a, y con preferencia se une a, un epítipo presente en CLDN18.2, con preferencia un epítipo situado dentro de los dominios extracelulares de CLDN18.2, en particular el primer bucle extracelular, con preferencia las posiciones de aminoácidos 29 a 78 de CLDN18.2. En modalidades particulares, un agente que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a un epítipo en CLDN18.2 que no está presente en CLDN18.1.

Un agente con capacidad de unirse a CLDN18.2 se une con preferencia a CLDN18.2, con preferencia humano, de ratón y/o cynomolgus, pero no a CLDN18.1, con preferencia de humano, ratón y/o cynomolgus. Con preferencia, un agente que se une a CLDN18.2 no se une a CLDN9, con preferencia de humano, ratón y/o cynomolgus. Con preferencia, un agente que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es específico para CLDN18.2. Con preferencia, un agente con capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a CLDN18.2 expresado en la superficie celular. En modalidades particularmente preferidas, un agente que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a epítopos nativos de CLDN18.2 presentes en la superficie de células vivas.

En algunas modalidades, un dominio de unión comprende un fragmento de anticuerpo. El término “fragmento” se refiere, en particular, a una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), con preferencia al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL). En algunas modalidades, dicha una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de la complementariedad CDR1,

CDR2 y CDR3. En una modalidad particularmente preferida, el término “fragmento” se refiere a las regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL).

5 En algunas modalidades, un dominio de unión que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en la presente comprende dichas CDR junto con sus regiones estructurales intermedias. Con preferencia, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50 % de una o ambas primer y cuarta regiones estructurales, el 50 % es el 50 % C-terminal de la primera región estructural y el 50 % N-terminal de la cuarta región estructural. La construcción de agentes de unión mediante 10 técnicas de ADN recombinante puede producir la introducción de residuos N- o C-terminales a las regiones variables codificadas por ligadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluida la introducción de ligadores para unir las regiones variables a otras secuencias proteicas, incluidas las cadenas pesadas de inmunoglobulina, otras regiones variables o marcas de proteína.

15 En algunas modalidades, un dominio de unión que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en la presente comprende dichas CDR en una estructura de anticuerpo humano.

La identificación exacta de las regiones CDR depende del método de cálculo utilizado para determinar los residuos de aminoácidos implicados. Por ejemplo, de acuerdo con Kabat 20 et al. (supra), las regiones variables en general abarcan los residuos de aminoácidos 24–34 (CDR1), 50–56 (CDR2) y 89–97 (CDR3) en el VL y aproximadamente 31–35 (CDR1), 50–65 (CDR2), y 95–102 (CDR3) en el VH; las regiones variables también pueden abarcar los residuos que forman un bucle hipervariable (por ejemplo, los residuos 26–32 (CDR1), 50–52 (CDR2) y 91–96 (CDR3) en el VH). por ejemplo, los residuos 26–32 (CDR1), 50–52 (CDR2) 25 y 91–96 (CDR3) en la VL y 26–32 (CDR1), 53–55 (CDR2) y 96–101 (CDR3) en la VH (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901–917)).

Un experto en la técnica comprenderá que la identificación exacta de las posiciones CDR dentro de las secuencias descritas en la presente puede ser ligeramente diferente de acuerdo con el sistema de numeración utilizado, como se muestra en la siguiente Tabla 1 (ver 30 Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55–77 (2003):

Tabla 1

	Kabat + Chothia	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
VH: CDR1	26–35	27–38	31–35	26–35	26–32	30–35
VH: CDR2	50–65	56–65	50–65	50–58	52–56	47–58
VH: CDR3	95–102	105–117	95–102	95–102	95–102	93–101
VL: CDR1	24–34	27–38	24–34	24–34	24–34	30–36
VL: CDR2	50–56	56–65	50–56	50–56	50–56	46–55
VL: CDR3	89–97	105–117	89–97	89–97	89–97	89–96

Así, las secuencias CDR divulgadas en la presente también comprenden variantes de las mismas derivadas de acuerdo con diferentes sistemas de numeración. En consecuencia, la descripción de cada VH es una descripción de las CDR (por ejemplo, CDR1, CDR2 y CDR3) derivables de la misma y la descripción de cada VL es una descripción de las CDR (por ejemplo, CDR1, CDR2 y CDR3) derivables de la misma.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se utiliza el sistema de numeración Kabat cuando se hace referencia a residuos en regiones variables (aproximadamente, residuos 1–107 de la cadena ligera y residuos 1–113 de la cadena pesada) de dominios de unión para CD3 o CLDN18.2, y el sistema de numeración EU para regiones CH1 y CH2–CH3 (incluyendo opcionalmente la bisagra), como se describe en la presente.

En algunas modalidades, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VH que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y/o CDR3 identificadas dentro de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VL que comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y/o CDR3 identificadas dentro de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende los siguientes conjuntos de CDR:

la VH comprende una CDR3 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 12 o una variante funcional de la misma, y

la VL comprende una CDR3 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15 o una variante funcional de la misma.

5 En algunas modalidades, la VH además comprende una CDR1 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10 o una variante funcional de la misma y/o una CDR2 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 11 o una variante funcional de la misma, y/o la VL además comprende una CDR1 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13 o una variante funcional de la misma, y/o una CDR2 que comprende la
10 secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende los siguientes conjuntos de CDR:

la VH comprende una CDR1 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10 o una variante funcional de la misma, una CDR2 que comprende la secuencia expuesta en
15 la SEQ ID NO: 11 o una variante funcional de la misma y una CDR3 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 12 o una variante funcional de la misma y la VL comprende una CDR1 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13 o una variante funcional de la misma, una CDR2 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14 o una variante funcional de la misma y una CDR3 que comprende la secuencia
20 expuesta en la SEQ ID NO: 15 o una variante funcional de la misma. Con preferencia, la VH comprende CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y la VL comprende CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 13, 14 y 15.

En algunas modalidades, dichas regiones variables de cadena pesada y liviana comprenden dichas regiones determinantes de complementariedad intercaladas dentro de las
25 regiones estructurales. En algunas modalidades, cada región variable comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, 2, y 3) y cuatro regiones estructurales (FR1, 2, 3, y 4). En algunas modalidades, dichas regiones determinantes de complementariedad y dichas regiones estructurales se disponen del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VH(CLDN18.2) que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 16 o una variante funcional de la misma.

5 En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende VL(CLDN18.2) que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 17 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad particularmente preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende la siguiente combinación de VH(CLDN18.2) y VL(CLDN18.2):

10 la VH(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 16 o una variante funcional de la misma y la VL(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o una variante funcional de la misma.

15 En una modalidad preferida, las regiones estructurales de los dominios de VH y VL presentes dentro de un agente de unión descrito en la presente puede comprender cambios de aminoácidos pero retienen al menos 80 %, 85 % o 90 % de identidad con una secuencia de línea germinal humana.

20 En modalidades adicionales, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente comprende regiones variables de cadena pesada y liviana de un anticuerpo que (i) compite por la unión a CLDN18.2 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y liviana como se describió anteriormente y/o (ii) tiene la especificidad por CLDN18.2 de un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y liviana como se describió anteriormente.

25 En algunas modalidades, un dominio de unión para CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente tiene el formato de una molécula Fab como se describe en la presente. En esta modalidad, una VH(CLDN18.2) es parte de la primera y la segunda cadena polipeptídica como se describe en la presente y a VL(CLDN18.2) es parte de la tercera cadena polipeptídica y la cuarta cadena polipeptídica es idéntica a la tercera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente.

Se debe entender que los dominios de unión que se unen a CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente en el formato Fab2–scFv pueden ser idénticos o esencialmente idénticos y, por lo tanto, se pueden unir a epítomos idénticos o esencialmente idénticos de CLDN18.2. Así, ambos dominios de unión que se unen a CLDN18.2 de un agente de unión descrito en la presente en el formato Fab2–scFv pueden corresponder o corresponder esencialmente a uno de los dominios de unión que se unen a CLDN18.2 descritos en la presente.

Con preferencia, el dominio de unión para CD3 es capaz de reconocer específicamente CD3 humano en el contexto de otras subunidades de TCR como las presentes en células T humanas primarias activadas que expresan el TCR en su configuración nativa.

En algunas modalidades, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VH que comprende CDR1, CDR2 y/o CDR3 identificadas dentro de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VH que comprende el siguiente conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3:

CDR1: SEQ ID NO: 18 o una variante funcional de la misma, CDR2: SEQ ID NO: 23 o una variante funcional de la misma, CDR3: SEQ ID NO: 19 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VL que comprende CDR1, CDR2 y/o CDR3 identificada dentro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 24.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VL que comprende el siguiente conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3:

CDR1: SEQ ID NO: 20 o una variante funcional de la misma, CDR2: SEQ ID NO: 21 o una variante funcional de la misma, CDR3: SEQ ID NO: 22 o una variante funcional de la misma.

5 En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende la siguiente combinación de VH y VL cada una que comprende un conjunto de CDR1, CDR2 y CDR3:

10 VH: CDR1: SEQ ID NO: 18 o una variante funcional de la misma, CDR2: SEQ ID NO: 23 o una variante funcional de la misma, CDR3: SEQ ID NO: 19 o una variante funcional de la misma, VL: CDR1: SEQ ID NO: 20 o una variante funcional de la misma, CDR2: SEQ ID NO: 21 o una variante funcional de la misma, CDR3: SEQ ID NO: 22 o una variante funcional de la misma.

15 En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 24 o una variante funcional de la misma.

20 En una modalidad preferida, un dominio de unión para CD3 de un agente de unión descrito en la presente comprende la siguiente VH y una VL:

la VH comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 25 o una variante funcional de la misma y la VL comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 24 o una variante funcional de la misma.

25 En algunas modalidades, el dominio de unión para CD3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 o una variante funcional de la misma.

En algunas modalidades, la CH1 de la primera y/o segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente se deriva de IgG, con preferencia IgG1, con más preferencia IgG1 humana. En algunas modalidades, los dominios CH2 y CH3 de la primera y/o segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente se derivan de IgG, con preferencia IgG1, con más preferencia IgG1 humana.

En algunas modalidades, la CL de la tercera y/o cuarta cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente se deriva de Igκ o Igλ, con preferencia Igκ, con más preferencia Igκ humana.

En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 7 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, la tercera y/o cuarta cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 9 o una variante funcional de la misma.

En una modalidad preferida, a agente de unión descrito en la presente comprende primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

la primera cadena polipeptídica comprende la SEQ ID NO: 7 o una variante funcional de la misma, la segunda cadena polipeptídica comprende la SEQ ID NO: 8 o una variante funcional de la misma, y la tercera cadena polipeptídica comprende la SEQ ID NO: 9 o una variante funcional de la misma,

en donde la cuarta cadena polipeptídica es idéntica a la tercera cadena polipeptídica.

En algunas modalidades, un agente de unión descrito en la presente comprende al menos dos dominios de unión para CLN18.2 y al menos un dominio de unión para CD3. En algunas modalidades, la primera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:

27 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, la segunda cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 28 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, la tercera cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, la cuarta cadena polipeptídica de un agente de unión descrito en la presente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 29 o una variante funcional de la misma. En algunas modalidades, a agente de unión descrito en la presente que comprende al menos dos dominios de unión que se unen a CLDN18.2 y al menos un dominio de unión que se une a CD3 comprende un conjunto de primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de acuerdo con las SEQ ID NO: 27, 28, 29, y 29.

Se debe entender que los agentes de unión descritos en la presente se pueden administrar a un paciente mediante la administración de un ácido nucleico tal como ARN que codifica el agente y/o mediante la administración de una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como ARN que codifica el agente. Si el agente de unión comprende más de una cadena polipeptídica, las diferentes cadenas polipeptídicas se pueden codificar en el mismo ácido nucleico o en diferentes ácidos nucleicos, por ejemplo, un conjunto de ácidos nucleicos. En consecuencia, un ácido nucleico para administrar puede ser una mezcla de diferentes moléculas de ácido nucleico, tal como un conjunto de ácidos nucleicos. Un ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos que codifica un agente de unión, por ejemplo, cuando se administra a un sujeto tal como un paciente, puede estar presente en forma desnuda o en un vehículo de administración adecuado, tal como en forma de liposomas o nanopartículas o partículas virales, o dentro de una célula huésped. El ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos proporcionado puede producir el agente durante periodos de tiempo prolongados de forma sostenida, mitigar la inestabilidad observada, al menos parcialmente, en los anticuerpos terapéuticos. Los ácidos nucleicos o conjuntos de ácidos nucleicos para administrar a un paciente se pueden producir por medios recombinantes. Si un ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos se administra a un paciente sin estar presente dentro de una célula huésped, con preferencia es captado por células del paciente para la expresión del agente de unión codificado por el ácido nucleico. Si un ácido nucleico o un conjunto de ácidos nucleicos se administra a un paciente mientras está presente dentro de una célula huésped, es preferible que la célula huésped lo exprese dentro del paciente para producir el agente de unión codificado por el ácido nucleico.

El término “recombinante” en el contexto de la presente invención significa “obtenido mediante ingeniería genética”. Con preferencia, un “objeto recombinante” como un ácido nucleico recombinante en el contexto de la presente invención no se encuentra de forma natural.

5 El término “natural”, tal como se utiliza en la presente, se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, un péptido o un ácido nucleico que está presente en un organismo (incluidos los virus) y que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio es natural.

10 El término “ácido nucleico”, tal como se utiliza en la presente, incluye el ADN y ARN, tal como ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas recombinantemente y moléculas sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser de cadena simple o cadena doble. El ARN incluye ARN transcrito *in vitro* (ARN IVT) o ARN sintético.

15 Los ácidos nucleicos o conjuntos de ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector. Los conjuntos de ácidos nucleicos también pueden estar comprendidos en conjuntos de vectores de manera que cada ácido nucleico del conjunto de ácidos nucleicos esté comprendido en un vector. El término “vector”, tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier vector conocido por el experto, que incluye vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores fago tales como fago lambda, vectores virales tales como vectores adenovirales o
20 baculovirales, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales P1 (PAC). Dichos vectores incluyen tanto vectores de expresión como de clonación. Los vectores de expresión comprenden plásmidos así como vectores virales y en general contienen una secuencia codificadora deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la
25 expresión de la secuencia codificadora ligada operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacterias, levaduras, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión *in vitro*. Los vectores de clonación se utilizan en general para diseñar y amplificar un determinado fragmento de ADN deseado y pueden carecer de las secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

30 En el contexto de la presente invención, el término “ARN” se refiere a una molécula

que comprende residuos de ribonucleótidos y, con preferencia, está compuesta total o sustancialmente por residuos de ribonucleótidos. “Ribonucleótido” se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosilo. El término incluye ARN de cadena doble, ARN de cadena simple, ARN aislado como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido recombinantemente, así como ARN modificado que difiere del ARN natural por la adición, supresión, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como en los extremos de un ARN o internamente, por ejemplo en uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos de las moléculas de ARN también pueden incluir nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos no naturales o nucleótidos sintetizados químicamente o desoxinucleótidos. Estos ARN alterados se pueden denominar análogos o análogos de ARN naturales.

De acuerdo con la presente invención, el término “ARN” incluye y se refiere con preferencia al “ARNm”, que significa “ARN mensajero” y se refiere a una “transcripto” que se puede producir utilizando ADN como molde y que codifica un péptido o una proteína. ARNm comprende típicamente una región 5' no traducida (5'-UTR), una región codificadora de proteínas o péptidos y una región 3' no traducida (3'-UTR). ARNm tiene un tiempo medio limitado en las células e *in vitro*. Con preferencia, ARNm se produce por transcripción *in vitro* utilizando un molde ADN. En algunas modalidades de la invención, ARNm se obtiene mediante transcripción *in vitro* o síntesis química. La metodología de transcripción *in vitro* es conocida por el experto. Por ejemplo, hay una variedad de kits de transcripción *in vitro* disponibles en el comercio.

En algunas modalidades, de la presente invención, ARN es ARN autorreplicante, tal como ARN autorreplicante de cadena simple. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante es ARN de cadena simple de sentido positivo. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante es ARN genómico alfaviral o se deriva de ARN genómico alfaviral. ARN alfaviral puede actuar como ARNm, como es conocido en la técnica. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En algunas modalidades, el virus es el virus del bosque Semliki. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes, al menos uno de dichos transgenes que codifica el agente de unión descrito en la presente. En algunas modalidades, si el ARN es ARN viral o derivado de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcial o completamente secuencias virales tales

como secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En algunas modalidades, el ARN autorreplicante es ARN transcrito *in vitro*.

5 Para aumentar la expresión y/o estabilidad del ARN utilizado de acuerdo con la presente invención, se puede modificar, con preferencia sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresados.

El término “modificación” en el contexto del ARN utilizado de acuerdo con la presente invención incluye cualquier modificación del ARN que no esté presente de forma natural en dicho ARN.

10 En algunas modalidades de la invención, el ARN utilizado de acuerdo con la invención no tiene 5'-trifosfatos sin tapón. La eliminación de dichos 5'-trifosfatos no tapados se puede lograr mediante el tratamiento del ARN con una fosfatasa.

15 El ARN de acuerdo con la invención puede tener ribonucleótidos naturales o sintéticos modificados para aumentar su estabilidad y/o disminuir la citotoxicidad y/o inmunogenicidad. Por ejemplo, En algunas modalidades, en el ARN utilizado de acuerdo con la invención la 5-metilcitidina se sustituye parcial o completamente, con preferencia completamente, por citidina. Alternativa o adicionalmente, En algunas modalidades, en el ARN utilizado de acuerdo con la invención la pseudouridina se sustituye parcial o completamente, con preferencia completamente, por uridina.

20 En algunas modalidades, el término “modificación” se refiere a proporcionar a un ARN una 5'-caperuza o un análogo de la 5'-caperuza. El término “5'-caperuza” se refiere a una estructura de caperuza que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y en general consiste en un nucleótido de guanosina conectado al ARNm a través de un enlace inusual de 5' a 5'-trifosfato. En algunas modalidades, esta guanosina está metilada en la posición 7. El término “5'-caperuza convencional” se refiere a una 5'-caperuza de ARN natural, 25 con preferencia a la caperuza de 7-metilguanosina (m7G). En el contexto de la presente invención, el término “5'-caperuza” incluye un análogo de 5'-caperuza que se asemeja a la estructura de caperuza del ARN y se modifica para poseer la capacidad de estabilizar el ARN si se une a él, con preferencia *in vivo* y/o en una célula.

La provisión de un ARN con una 5'-caperuza o un análogo de la 5'-caperuza se puede lograr mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN en presencia de dicha 5'-caperuza o análogo de la 5'-caperuza, en la que dicha 5'-caperuza se incorpora de forma cotranscripcional a la cadena de ARN generada, o el ARN se puede generar, por ejemplo, mediante transcripción *in vitro*, y la 5'-caperuza se puede unir al ARN de forma postranscripcional utilizando enzimas de tapado, por ejemplo, enzimas de tapado del virus vaccinia.

El ARN puede incluir otras modificaciones. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente invención puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) natural o una alteración de las regiones 5'- o 3'-no traducidas (UTR), tal como la introducción de una UTR que no esté relacionada con la región codificadora de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de una o más, con preferencia dos copias de una 3'-UTR derivada de un gen de globina, tal como alfa2-globina, alfa1-globina, beta-globina, con preferencia beta-globina, con más preferencia beta-globina humana.

Por lo tanto, para aumentar la estabilidad y/o expresión del ARN utilizado de acuerdo con la presente invención, se puede modificar para que esté presente junto con una secuencia poli-A, con preferencia que tiene una longitud de 10 a 500, con más preferencia de 30 a 300, aún con más preferencia de 65 a 200 y especialmente de 100 a 150 residuos de adenosina. En una modalidad especialmente preferida, la secuencia poli-A tiene una longitud de aproximadamente 120 residuos de adenosina. Además, la incorporación de dos o más regiones 3'-no traducidas (UTR) en la región 3'-no traducida de una molécula de ARN puede producir una mejora de la eficiencia de traducción. En una modalidad particular, la 3'-UTR se deriva del gen de la β -globina humana.

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

El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. A efectos de la presente invención, el término "transfección" también incluye la introducción de un ácido nucleico en una célula o la captación de un ácido nucleico por dicha célula, en la que la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un

paciente. Así, de acuerdo con la presente invención, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrita en la presente puede estar presente *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, la célula puede formar parte de un órgano, un tejido y/o un organismo de un paciente. De acuerdo con la invención, la transfección puede ser transitoria o estable. Para algunas
5 aplicaciones de la transfección, es suficiente que el material genético transfectado se exprese solo transitoriamente. Debido a que el ácido nucleico introducido en el proceso de transfección normalmente no se integra en el genoma nuclear, el ácido nucleico extraño se diluirá a través de la mitosis o se degradará. Las células que permiten la amplificación episomal de ácidos nucleicos reducen en gran medida la tasa de dilución. Si se desea que el ácido nucleico
10 transfectado permanezca realmente en el genoma de la célula y sus células hijas, se debe producir una transfección estable. El ARN se puede transfectar en las células para expresar transitoriamente su proteína codificada.

El término “estabilidad” del ARN está relacionado con la “vida media” del ARN. “Vida media” se refiere al periodo de tiempo necesario para eliminar la mitad de la actividad,
15 cantidad o número de moléculas. En el contexto de la presente invención, la vida media de un ARN es indicativa de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influir en la “duración de la expresión” del ARN. Cabe esperar que el ARN que tenga una vida media larga se exprese durante un periodo de tiempo prolongado.

En el contexto de la presente invención, el término “transcripción” se refiere a un
20 proceso en el que el código genético de una secuencia de ADN se transcribe en ARN. Posteriormente, el ARN se puede traducir en proteína. De acuerdo con la presente invención, el término “transcripción” comprende la “transcripción *in vitro*”, en la que el término “transcripción *in vitro*” se refiere a un proceso en el que el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células, con preferencia utilizando extractos celulares
25 apropiados. Con preferencia, se aplican vectores de clonación para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan en general como vectores de transcripción y, de acuerdo con la presente invención, se engloban en el término “vector”.

El término “traducción” de acuerdo con la invención se refiere al proceso en los
ribosomas de una célula por el que una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de
30 una secuencia de aminoácidos para obtener un péptido o proteína.

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

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

El término “expresado específicamente” significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, un antígeno tumoral expresado específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica y no se expresa en otros tejidos o no se expresa en una medida significativa en otros tipos de tejidos u órganos. Así, una proteína que se expresa exclusivamente en células de la mucosa gástrica y en una medida significativamente menor en cualquier otro tejido, como los testículos, se expresa específicamente en células de la mucosa gástrica. En algunas modalidades, un antígeno tumoral también se puede expresar específicamente en condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejidos u órganos, pero con preferencia en no más de 3 tipos de tejidos u órganos diferentes. En este caso, el antígeno tumoral se expresa específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno tumoral se expresa en condiciones normales con preferencia en una medida aproximadamente igual en pulmón y estómago, dicho antígeno tumoral se expresa específicamente en pulmón y estómago.

De acuerdo con la invención, el término “ARN codificador” significa que el ARN, si está presente en el entorno apropiado, con preferencia dentro de una célula, se puede expresar para producir una proteína o péptido que codifica.

Algunos aspectos de la invención se basan en la transferencia adoptiva de células huésped que se transfectan *in vitro* con un ácido nucleico tal como el ARN que codifica un agente de unión descrito en la presente y se transfieren a receptores tales como pacientes, con preferencia después de la expansión *ex vivo* a partir de bajas frecuencias de precursores hasta números de células clínicamente relevantes. Las células huésped utilizadas para el tratamiento de acuerdo con la invención pueden ser autólogas, alogénicas o singénicas a un receptor tratado.

El término “autólogo” se utiliza para describir cualquier cosa que se derive del mismo sujeto. Por ejemplo, “trasplante autólogo” se refiere a un trasplante de tejidos u órganos derivados del mismo sujeto. Estos procedimientos son ventajosos porque superan la barrera inmunológica que, de otro modo, produce rechazo.

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

El término “singénico” se utiliza para describir cualquier derivado de individuos o tejidos que tienen genotipos idénticos, es decir, gemelos idénticos o animales de la misma cepa endogámica, o sus tejidos.

El término “heterólogo” se utiliza para describir algo que consiste en múltiples elementos diferentes. Por ejemplo, la transferencia de la médula ósea de un individuo a otro constituye un trasplante heterólogo. Un gen heterólogo es un gen derivado de una fuente distinta del sujeto.

El término “péptido” de acuerdo con la invención comprende oligo– y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, con preferencia 3 o más, con preferencia 4 o más, con preferencia 6 o más, con preferencia 8 o más, con preferencia 9 o más, con preferencia 10 o más, con preferencia 13 o más, con preferencia 16 más, con preferencia 21 o más y hasta con preferencia 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos de forma covalente mediante enlaces peptídicos. El término “proteína” se refiere a péptidos grandes, con preferencia a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos “péptidos” y “proteínas” son sinónimos y se utilizan indistintamente en la

presente.

Las enseñanzas que aquí se dan con respecto a secuencias específicas de aminoácidos, por ejemplo, las que se muestran en el listado de secuencias, se deben interpretar en el sentido de que también se refieren a variantes de dichas secuencias específicas que producen secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que presentan propiedades idénticas o similares a las de las secuencias específicas de aminoácidos. Una propiedad importante es mantener la unión a una diana o mantener las funciones efectoras. Con preferencia, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a CLDN18.2 y/o CD3 y con preferencia funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente. Además, con preferencia, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un agente de unión retiene la unión de dicho agente de unión a CLDN18.2 y/o CD3 y con preferencia funciones de dicho agente de unión como se describe en la presente, por ejemplo, lisis mediada por células T citotóxicas.

Por ejemplo, las secuencias mostradas en el listado de secuencias se pueden modificar para eliminar uno o más, con preferencia todos los residuos de cisteína libres, en particular mediante el reemplazo de los residuos de cisteína con aminoácidos distintos de la cisteína, con preferencia serina, alanina, treonina, glicina, tirosina, triptófano, leucina o metionina.

Los expertos en la técnica apreciarán que, en particular, las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables se pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLDN18.2 y/o CD3. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones especificadas en la presente. Por “altamente homóloga” se contempla que se pueden realizar de 1 a 5, con preferencia de 1 a 4, tal como de 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables se pueden modificarse de modo que muestren homología sustancial con las regiones específicamente divulgadas en la presente. En algunas modalidades, las secuencias de región variable solo se desvían en las secuencias estructurales de las secuencias de región variable específicamente descritas en la presente.

Los agentes de unión descritos en la presente se pueden producir en forma intracelular (por ejemplo, en el citosol, en el periplasma o en cuerpos de inclusión) y luego aislarse de las células huésped y, opcionalmente, purificarse más; o se pueden producir en forma extracelular (por ejemplo, en el medio en el que se cultivan las células huésped) y luego aislarse del medio de cultivo y, opcionalmente, purificarse más. Los métodos y reactivos utilizados para la producción recombinante de polipéptidos, tales como vectores de expresión específicos adecuados, métodos de transformación o transfección, marcadores de selección, métodos de inducción de la expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares, son conocidos en la técnica. Del mismo modo, las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas son bien conocidas por el experto.

El término “célula” o “célula huésped” se refiere con preferencia a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales, tales como enzimas, organelas o material genético. Una célula intacta es con preferencia una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Con preferencia dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que se pueda transfectar con un ácido nucleico exógeno. Con preferencia, la célula, cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno y se transfiere a un receptor, puede expresar el ácido nucleico en el receptor. El término “célula” incluye células bacterianas; otras células útiles son células de levadura, células fúngicas o células de mamífero. Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas bacterianas gramnegativas, tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus* y *Pseudomonas*, y cepas bacterianas grampositivas, como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphilococcus* y *Lactococcus*. Las células fúngicas adecuadas incluyen células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuadas incluyen células de especies de *Saccharomyces* (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*. Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS, 293 HEK y similares. Sin embargo, también se pueden utilizar células de anfibios, insectos, plantas y cualquier otra célula utilizada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas. Las células de mamíferos son particularmente preferidas para la transferencia adoptiva, tales como las células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células se pueden derivar de un gran número de tipos de tejidos e incluir células primarias y líneas celulares tales como células del sistema inmunitario, en particular células presentadoras de antígenos tales como

células dendríticas y células T, células madre tales como células madre hematopoyéticas y células madre mesenquimales y otros tipos de células. Una célula presentadora de antígenos es una célula que muestra antígenos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su receptor de células T (TCR).

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

Los agentes de unión descritos en la presente también se pueden analizar en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones inmunodeficientes portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLDN18.2) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan CLDN18.2.

“Reducir”, “disminuir” o “inhibir”, tal como se utilizan en la presente, significa una disminución global o la capacidad de causar una disminución global, con preferencia 5 % o más, 10 % o más, 20 % o más, con más preferencia 50 % o más, y con más preferencia 75 % o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de expresión o en el nivel de proliferación de las células.

Los términos tales como “aumentar” o “mejorar” con preferencia se refieren a un aumento o mejora en aproximadamente al menos 10 %, con preferencia al menos 20 %, con preferencia al menos 30 %, con más preferencia al menos 40 %, con más preferencia al menos 50 %, incluso con más preferencia al menos 80 %, y con máxima preferencia al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10000 % o incluso más.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

La ADCC describe la capacidad de destrucción celular de las células efectoras descritas en la presente, en particular los linfocitos, que requiere con preferencia que la célula diana esté marcada por un anticuerpo.

La ADCC se produce con preferencia cuando los anticuerpos se unen a los antígenos de las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se acoplan a los receptores Fc (FcR) de la superficie de las células efectoras inmunitarias. Se han identificado varias familias de receptores Fc, y poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores Fc definidos. La ADCC se puede considerar un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas al tumor. Con preferencia, la inducción *in vivo* de ADCC llevará a respuestas de células T dirigidas al tumor y respuestas de anticuerpos derivados del huésped.

10 Fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos

La ADCP es uno de los mecanismos de acción de muchas terapias con anticuerpos. Se define como un proceso altamente regulado mediante el cual los anticuerpos eliminan las dianas unidas conectan su dominio Fc a receptores específicos de células fagocíticas y provocan la fagocitosis. La ADCP puede estar mediada por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, a través de FcγRIIa, FcγRI y FcγRIIIa, de los cuales FcγRIIa (CD32a) en macrófagos representa la vía predominante.

La ADCP se produce con preferencia cuando las células fagocíticas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo que está unido a las células diana, tales como las células enfermas, incluidas las células tumorales, y posteriormente provocan la fagocitosis de las células diana, tales como las células enfermas, incluidas las células tumorales. La ADCP también estimula las respuestas inmunitarias adaptativas corriente abajo al facilitar la presentación de antígenos o estimular la secreción de mediadores inflamatorios. La ADCP se puede mejorar *in vivo* mediante el tratamiento simultáneo con agentes inmunomoduladores. La función dependiente del receptor Fc de la ADCP proporciona mecanismos para la eliminación del virus y las células infectadas por el virus, así como para la estimulación de las respuestas inmunitarias adaptativas posteriores de este modo se facilita la presentación del antígeno o estimula la secreción de mediadores inflamatorios.

Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos.

La IgM es el isotipo más eficaz para la activación del complemento. IgG1 IgG3 también son muy eficaces para dirigir la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Con preferencia, en esta cascada, la formación de complejos antígeno–anticuerpo da como resultado el desbloqueo de múltiples sitios de unión de C1q en estrecha proximidad en los dominios CH2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Con preferencia, estos sitios de unión de C1q desbloqueados convierten la interacción C1q–IgG, previamente de baja afinidad, en una de alta avidez, lo que desencadena una cascada de eventos que implican a una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Con preferencia, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula.

Quimerización

Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La principal inmunogenicidad está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los agentes de unión derivados de anticuerpos murinos en el hombre se puede reducir o evitar completamente si los agentes de unión respectivos se quimerizan o humanizan. Los agentes de unión quiméricos son agentes de unión cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de los agentes de unión se obtiene mediante la unión de las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y liviana humana (por ejemplo, como describen Kraus et al., en la serie *Methods in Molecular Biology, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN–0–89603–918–8). En una modalidad preferida, los agentes de unión quiméricos se generan mediante la unión de la región constante de la cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En una modalidad también preferida, los agentes de unión quiméricos se pueden generar mediante la unión de la región constante de la cadena ligera lambda humana a la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de agentes de unión quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de agentes de

unión quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

Humanización

Los agentes de unión, tal como los anticuerpos, interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos situados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y liviana. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo–antígeno, es posible expresar agentes de unión recombinantes, por ejemplo, anticuerpos que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertadas en secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332: 323–327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321: 522–525; y Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029–10033). Dichas secuencias estructurales se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias genéticas de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias genéticas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en cada uno de los puntos de la región variable.

Agente que estabiliza o aumenta la expresión de claudina 18.2 (CLDN18.2)

En la presente se demuestra que la administración de un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 soporta la eficacia de un agente de unión biespecífico como se describe en la presente. En algunas modalidades, en la presente se proporciona una terapia de combinación para tratar y/o prevenir eficazmente enfermedades cancerosas que comprenden la administración a un paciente de un agente de unión biespecífico como el descrito en la presente y un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2. El agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 se puede administrar antes, simultáneamente o después de la administración del agente de unión biespecífico, o una

combinación de los mismos.

Se demostró que ciertos agentes quimioterapéuticos, por ejemplo gemcitabina, oxaliplatino y 5-fluorouracilo, aumentan los niveles de expresión de CLDN18.2 existentes en células cancerosas (WO2013/174510; Türeci Ö. et al. (2019) *Oncolmunology*, 8:1).

5 El término “agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2” se refiere a un agente o una combinación de agentes cuyo suministro a las células produce un aumento de los niveles de ARN y/o proteína de CLDN18.2, con preferencia un aumento de los niveles de proteína CLDN18.2 en la superficie celular, en comparación con la situación en la que las células no reciben el agente o la combinación de agentes. Con preferencia, las células son
10 células cancerosas, en particular células cancerosas que expresan CLDN18.2. El término “agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2” se refiere, en particular, a un agente o una combinación de agentes cuyo suministro a las células produce una mayor densidad de CLDN18.2 en la superficie de dichas células en comparación con la situación en la que las células no reciben el agente o la combinación de agentes. “Estabilización de la
15 expresión de CLDN18.2” incluye, en particular, la situación en la que el agente o la combinación de agentes evita una disminución o reduce una disminución de la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 puede disminuir sin el suministro del agente o la combinación de agentes y el suministro del agente o la combinación de agentes evita dicha disminución o reduce dicha disminución de la expresión de CLDN18.2. “Aumento de la expresión de CLDN18.2” incluye, en particular, la situación en la que el agente o la
20 combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18.2, por ejemplo, la expresión de CLDN18.2 puede disminuir, permanecer esencialmente constante o aumentar sin la provisión del agente o la combinación de agentes y la provisión del agente o la combinación de agentes aumenta la expresión de CLDN18. 2 en comparación con la situación sin la administración del
25 agente o la combinación de agentes, de modo que la expresión resultante es mayor en comparación con la situación en la que la expresión de CLDN18.2 puede disminuir, permanecer esencialmente constante o aumentar sin la administración del agente o la combinación de agentes.

En algunas modalidades, el término “agente que estabiliza o aumenta la expresión de
30 CLDN18.2” incluye agentes quimioterapéuticos o combinaciones de agentes quimioterapéuticos tales como agentes citostáticos. En algunas modalidades, el agente que

estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede ser un agente citotóxico y/o citostático.

En algunas modalidades, el término “agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2” se refiere a un agente o una combinación de agentes tales como un compuesto citostático o una combinación de compuestos citostáticos cuyo suministro a las células, en particular a las células cancerosas, produce que las células se detengan o se acumulen en una o más fases del ciclo celular, con preferencia en una o más fases del ciclo celular distintas de las fases G1– y G0, con preferencia distintas de la fase G1, con preferencia en una o más de las fases G2– o S– del ciclo celular, o una combinación de las mismas, o una combinación de la fase S o la fase G2 con la fase G1, tal como la fase G1/G2–, S/G2–, G2– o S– del ciclo celular. El término “células que se detienen o acumulan en una o más fases del ciclo celular” significa que aumenta el porcentaje de células que se encuentran en dicha una o más fases del ciclo celular. Cada célula atraviesa un ciclo que comprende cuatro fases para replicarse. La primera fase, llamada G1, es cuando la célula se prepara para replicar sus cromosomas. La segunda fase se denomina S, y en ella se produce la síntesis del ADN y se duplica el ADN. La siguiente fase es la G2, en la que se duplican el ARN y las proteínas. La última fase es la fase M, que es la fase de la división celular propiamente dicha. En esta fase final, el ADN y el ARN duplicados se dividen y se desplazan a extremos separados de la célula, y la célula se divide realmente en dos células idénticas y funcionales. Los agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN normalmente provocan una acumulación de células en las fases G1 y/o G2. Los agentes quimioterapéuticos que bloquean el crecimiento celular mediten la interferencia en la síntesis del ADN, tal como los antimetabolitos, usualmente producen una acumulación de células en fase S. Los ejemplos de estos fármacos son la 6–mercaptopurina y el 5–fluorouracilo.

En algunas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en antraciclinas, análogo de nucleósidos, compuestos de platino, análogos de camptotecina y taxanos, profármacos de los mismos, sales de los mismos, y combinaciones de los mismos. La antraciclina se puede seleccionar del grupo que consiste en epirrubicina, doxorrubicina, daunorrubicina, idarrubicina, valrubicina, profármacos de las mismas y sales de las mismas. La antraciclina se puede seleccionar del grupo de la epirrubicina, profármacos de los mismos y sales de los mismos. Con preferencia, la antraciclina es epirrubicina. El análogo de nucleósido se puede seleccionar del grupo que consiste en gemcitabina, 5–fluorouracilo, profármacos de los mismos y sales de los mismos. El compuesto de platino se puede

seleccionar del grupo que consiste en oxaliplatino, cisplatino, profármacos de los mismos y sales de los mismos. El análogo de la camptotecina se puede seleccionar del grupo que consiste en irinotecano, el topotecano, profármacos de los mismos y sales de los mismos. El taxano se puede seleccionar del grupo que consiste en paclitaxel, docetaxel, profármacos de los mismos y sales de los mismos.

En algunas modalidades, una referencia a un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2, tal como una referencia a una antraciclina, un análogo de nucleósido, un compuesto de platino, un análogo de camptotecina o un taxano, por ejemplo, una referencia a gemcitabina, 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecano o paclitaxel es para incluir cualquier profármaco tal como éster, sal o derivado como conjugado de dicho agente. Algunos ejemplos son los conjugados de dicho agente con una sustancia portadora, por ejemplo, paclitaxel unido a proteínas, tal como paclitaxel unido a albúmina. Con preferencia, las sales de dicho agente son farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, un “agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2” comprende un “agente que induce la muerte celular inmunogénica”.

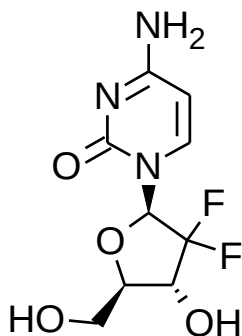
En circunstancias específicas, las células cancerosas pueden entrar en una vía de estrés letal unida a la emisión de una combinación de señales definida espaciotemporalmente que es descodificada por el sistema inmunitario para activar respuestas inmunitarias específicas del tumor (Zitvogel L. et al. (2010) Cell 140: 798–804). En este escenario, las células cancerosas se activan para emitir señales que son detectadas por efectores inmunitarios innatos, tales como las células dendríticas, para desencadenar una respuesta inmunitaria cognada que implica células T CD8+ y la señalización de IFN- γ , de modo que la muerte de las células tumorales pueda provocar una respuesta inmunitaria anticáncer productiva. Estas señales incluyen la exposición pre-apoptótica de la calreticulina (CRT) chaperona del retículo endoplásmico (ER) en la superficie celular, la secreción pre-apoptótica de ATP y la liberación post-apoptótica de la proteína nuclear HMGB1. En conjunto, estos procesos constituyen los determinantes moleculares de la muerte celular inmunogénica (ICD). Las antraciclinas, el oxaliplatino y la irradiación y son capaces de inducir todas las señales que definen la ICD, mientras que el cisplatino, por ejemplo, que es deficiente para inducir la translocación de CRT desde el ER a la superficie de las células moribundas –un proceso que requiere estrés de ER– requiere la complementación con el thapsigargin, un inductor de estrés de ER.

Como se usa en la presente, el término “agente inductor de muerte celular inmunogénica” se refiere a un agente o una combinación de agentes que, cuando se suministran a las células, en particular a las células cancerosas, son capaces de inducir a las células a entrar en una vía de estrés letal que finalmente produce las respuestas inmunitarias específicas del tumor. En particular, un agente que induce la muerte celular inmunogénica cuando se proporciona a las células induce a las células a emitir una combinación de señales definida espaciotemporalmente, que incluye, en particular, la exposición preapoptótica de la calreticulina (CRT) chaperona del retículo endoplásmico (ER) en la superficie celular, la secreción preapoptótica de ATP y la liberación posapoptótica de la proteína nuclear HMGB1.

Como se usa en la presente, el término “agente inductor de muerte celular inmunogénica” incluye antraciclinas tales como epirubicina y oxaliplatino.

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

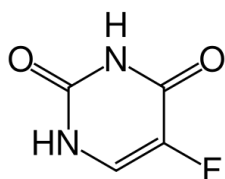
El término “gemcitabina” se refiere a un compuesto que es un análogo nucleósido de la siguiente fórmula:



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

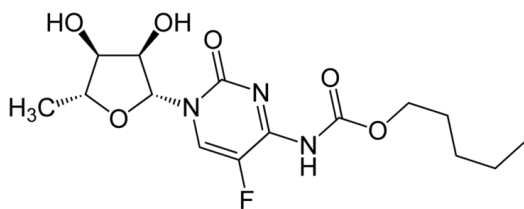
El término “análogo de nucleósido” incluye derivados de fluoropirimidina tales como fluorouracilo y profármacos de los mismos. El término “fluorouracilo” o “5-fluorouracilo” (5-FU o f5U) (comercializados con las marcas Adrucil, Carac, Efudix, Efudex y Fluoroplex) es un

compuesto que es un análogo de pirimidina de la siguiente fórmula:



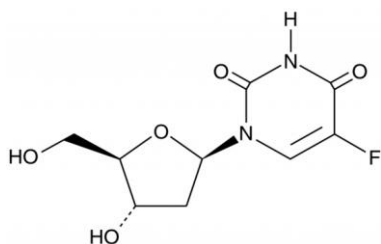
En particular, el término se refiere al compuesto 5-fluoro-1H-pirimidine-2,4-diona.

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



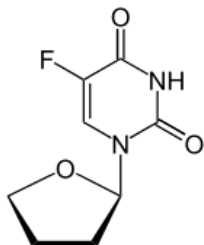
En particular, el término se refiere al compuesto [1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofuran-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbamato de pentilo.

- 10 “Floxuridina” (5-fluorodeoxiuridina) es un fármaco oncológico que se cataboliza rápidamente a 5-fluorouracilo, que es la forma activa del fármaco. Floxuridina tiene la siguiente fórmula:



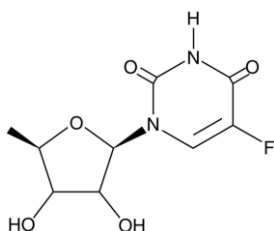
“Tegafur” (5-fluoro-1-(oxolan-2-il)pirimidin-2,4-diona) es un profármaco

quimioterapéutico de 5-fluorouracilo. Cuando se metaboliza, es 5-fluorouracilo. Tegafur tiene la siguiente fórmula:

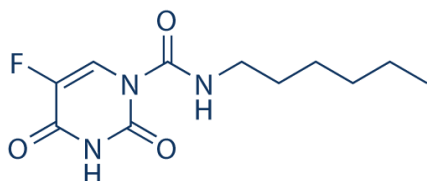


5 El término “doxifluridina” (5'-deoxi-5-fluorouridina) es un derivado de fluoropirimidina del 5-fluorouracilo. Este profármaco análogo de nucleósido de segunda generación se utiliza como agente citostático en quimioterapia en varios países asiáticos, que incluye China y Corea del Sur. Dentro de una célula, la pirimidina nucleósido fosforilasa o la timidina fosforilasa pueden metabolizar la doxifluridina en 5-fluorouracilo. También es un metabolito de la capecitabina. La doxifluridina que se puede administrar por vía oral tiene la siguiente fórmula:

10



El término “Carmofur” (INN) o “HCFU” se refiere a 1-hexilcarbamoil-5-fluorouracilo:

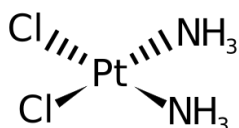


Este compuesto es un análogo de la pirimidina utilizado como agente antineoplásico.

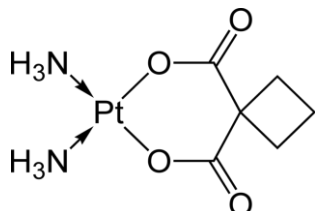
Es un derivado del fluorouracilo, que es un análogo enmascarado lipófilo del 5-fluorouracilo. Una vez dentro de la célula, el profármaco carmofur se convierte en 5-fluorouracilo.

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

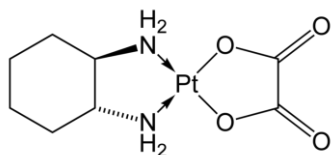
El término “cisplatino” o “cisplatinum” se refiere al compuesto cis-diaminodicloroplatino(II) (CDDP) de la siguiente fórmula:



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



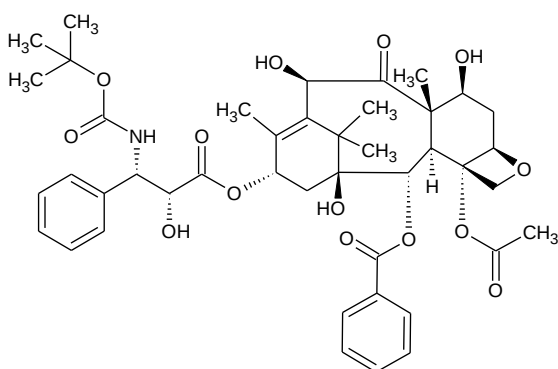
El término “oxaliplatino” se refiere a un compuesto que es un compuesto de platino complejoado a un ligando portador diaminociclohexano de la siguiente fórmula:



En particular, el término “oxaliplatino” se refiere al compuesto [(1R,2R)-ciclohexano-1,2-diamina](etanodioato-O,O')platino(II). El oxaliplatino inyectable también se comercializa con el nombre comercial de Eloxatina.

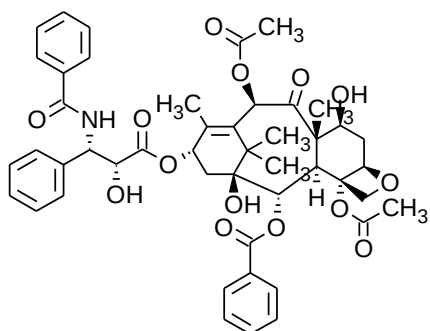
Los taxanos son una clase de compuestos diterpénicos que primero se obtuvieron de fuentes naturales tales como las plantas del género *Taxus*, pero algunos se han sintetizado artificialmente. El principal mecanismo de acción de los taxanos es la alteración de la función de los microtúbulos, de este modo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

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



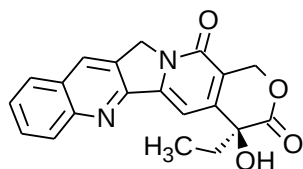
En particular, el término “docetaxel” se refiere al compuesto 1,7 β ,10 β -trihidroxi-9-oxo-5 β ,20-epoxitax-11-ene-2 α ,4,13 α -triilo 4-acetato 2-benzoato 13-[(2R,3S)-3-[(terbutoxicarbonil)-amino]-2-hidroxi-3-fenilpropanoato}].

El término “paclitaxel” se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula:



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

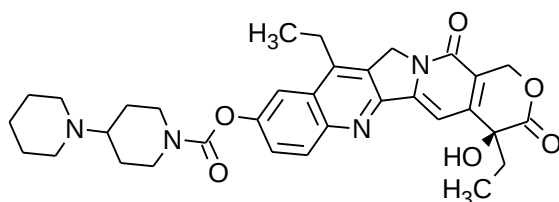
El término “análogo de camptotecina” se refiere a derivados del compuesto camptotecina (CPT; (S)-4-etil-4-hidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]-quinolina-3,14-(4H,12H)-diona). Con preferencia, el término “análogo de camptotecina” se refiere a compuestos que comprende la siguiente estructura:



5

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

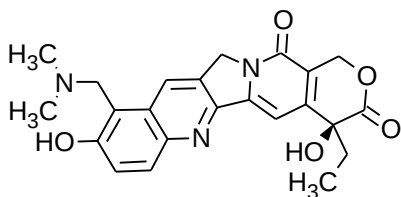
El irinotecano es un fármaco que impide que el ADN se desenrolle mediante la inhibición de la topoisomerasa I. En términos químicos, es un análogo semisintético del alcaloide natural camptotecina que tiene la siguiente fórmula:



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

15

Topotecano es un inhibidor de la topoisomerasa de la fórmula:



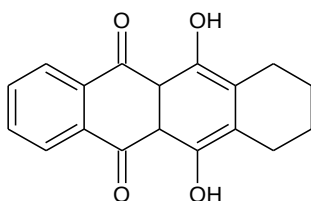
En particular, el término “topotecano” se refiere al compuesto monohidrato de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-3,14(4H,12H)-diona.

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

10 Las antraciclinas ejercen con preferencia uno o varios de los siguientes mecanismos de acción: 1) Inhibición de la síntesis de ADN y ARN al intercalarse entre los pares de bases de la cadena de ADN/ARN, de este modo impiden la replicación de las células cancerosas de crecimiento rápido; 2) Inhibición de la enzima topoisomerasa II, lo que impide la relajación del ADN superenrollado y así se bloquea la transcripción y replicación del ADN; y 3) Creación de radicales libres de oxígeno mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares.

15 El término “antraciclina” se refiere con preferencia a un agente, con preferencia un agente anticáncer para inducir la apoptosis, con preferencia mediante la inhibición de la nueva unión del ADN en la topoisomerasa II.

Con preferencia, el término “antraciclina” se refiere en general a una clase de compuestos que tienen la siguiente estructura de anillo

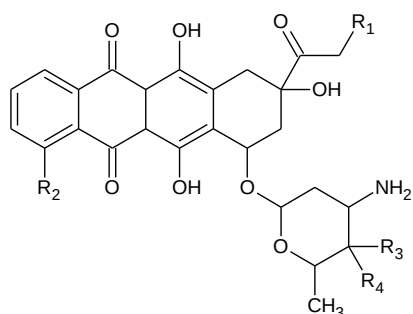


20 que incluyen análogos y derivados, sales farmacéuticas, hidratos, ésteres, conjugados y profármacos de los mismos.

Ejemplos de antraciclinas y análogos de antraciclinas incluyen, pero no se limitan a, daunorrubicina (daunomicina), doxorubicina (adriamicina), epirubicina, idarrubicina,

rodomicina, pirarrubicina, valrubicina, N-trifluoro-acetil doxorrubicina-14-valerato, aclacinomicina, morfolinodoxorrubicina (morfolino-DOX), cianomorfolino-doxorrubicina (ciano-morfolino-DOX), 2-pirrolino-doxorrubicina (2-PDOX), 5-iminodaunomicina, mitoxantrona y aclacinomicina A (aclarrubicina). La mitoxantrona pertenece a la clase de los
5 compuestos antracendiona, que son análogos de las antraciclinas que carecen del resto de azúcar de las antraciclinas, pero conservan la estructura de anillo aromático policíclico planar que permite la intercalación en el ADN.

Se prefiere particularmente como antraciclina un compuesto de la siguiente fórmula:

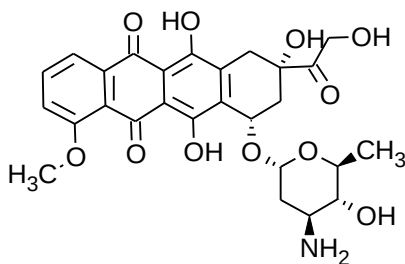


10 en donde

R₁ se selecciona del grupo que consiste en H y OH, R₂ se selecciona del grupo que consiste en H y OMe, R₃ se selecciona del grupo que consiste en H y OH, y R₄ se selecciona del grupo que consiste en H y OH.

15 En una modalidad, R₁ es H, R₂ es OMe, R₃ es H, y R₄ es OH. En otra modalidad, R₁ es OH, R₂ es OMe, R₃ es H, y R₄ es OH. En otra modalidad, R₁ es OH, R₂ es OMe, R₃ es OH, y R₄ es H. En otra modalidad, R₁ es H, R₂ es H, R₃ es H, y R₄ es OH.

Específicamente contemplada como antraciclina está la epirrubicina. La epirrubicina es un fármaco antraciclina que tiene la siguiente fórmula:



y se comercializa con la marca Ellence en US y Pharmorubicin o Epirubicin Ebewe en las demás partes. En particular, el término “epirubicina” se refiere al compuesto (8R,10S)–10–[(2S,4S,5R,6S)–4–amino–5–hidroxi–6–metil–oxan–2–il]oxi–6,11–dihidroxi–8–(2–hidroxiacetil)–1–methoxi–8–metil–9,10–dihidro–7H–tetracen–5,12–diona. La epirubicina se prefiere a la doxorubicina, la antraciclina más popular, en algunos regímenes de quimioterapia, ya que parece causar menos efectos secundarios.

Un agente de unión biespecífico descrito en la presente se puede administrar a un sujeto de forma simultánea o secuencial en cualquier orden con un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2. Por ejemplo, un agente de unión biespecífico se puede administrar antes de la administración de un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 o un agente de unión biespecífico se puede administrar después de la administración de un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2.

Las composiciones descritas en la presente pueden incluir otros agentes y los métodos descritos en la presente pueden comprender la administración de otros agentes. En algunas modalidades, dichos agentes son útiles en los tratamientos descritos en la presente. En algunas modalidades, dichos agentes son útiles para prevenir la formación de vasos sanguíneos. En algunas modalidades, dichos agentes comprenden un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano. En algunas modalidades, dichos agentes son útiles para mejorar la función de las células T. En algunas modalidades, dichos agentes comprenden un inhibidor del punto de control inmunitario.

Anticuerpo que se une a VEGFR2 humano

Los vasos sanguíneos tumorales transportan nutrientes para la aparición y el desarrollo de tumores y proporcionan canales de escape a las células tumorales. Los

fármacos dirigidos a la angiogénesis pueden bloquear el suministro de nutrientes a los tumores, de este modo se obtiene el efecto de “matar de hambre” al tumor. Sin embargo, la angiogénesis tumoral está ampliamente regulada por diversos factores de crecimiento, receptores y vías de señalización corriente abajo en el microambiente tumoral. Entre ellos, el factor de crecimiento endotelial vascular (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF) se une a su receptor (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGFR) y desempeña un papel importante en el proceso de formación fisiológica y patológica de vasos sanguíneos.

VEGFR2 (también conocido como FLK-1, o KDR), es el principal miembro de la familia VEGFR, es un receptor tirosina quinasa de tipo III, y se distribuye principalmente en la superficie de la membrana de las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos. El dominio extracelular del VEGFR2 contiene 7 dominios tipo inmunoglobulinas (es decir, D1–D7), que incluye el dominio de unión al ligando VEGF (D2–D3) y el dominio de dimerización (D4–D7), y su dominio intracelular contiene un dominio tirosina quinasa. Cuando la alta concentración de dímero de VEGF en el microambiente tumoral se une a VEGFR2, induce a los receptores VEGFR2 a formar homodímeros (primarios), y heterodímeros con VEGFR1 o VEGFR3 (secundarios), lo que provoca la autofosforilación intracelular de VEGFR2 de residuos de tirosina en la región, lo que finalmente causa la angiogénesis tumoral.

En algunas modalidades, tal como se usa en la presente, el término “VEGFR2” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 30 o una de sus variantes, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, tal como se usa en la presente, el término “VEGFR2” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, tal como se usa en la presente, el término “VEGFR2” se refiere al polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es la que se da en la SEQ ID NO: 30. VEGFR2 también se conoce como receptor del dominio quinasa (KDR). Como se usa en la presente, el término “dominio extracelular de VEGFR2” o “VEGFR2–ECD” significa la proteína que comienza y termina en los aminoácidos 1 y 744, respectivamente, de la SEQ ID NO: 30.

(VEGFR2; SEQ ID NO: 30)

ASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKANTTLQITCRGQRDLDLWLPNNQSGSEQRVEVTEC

SDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVVYIT
 ENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF
 CEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIELSVGEKLVNLCTARTELVNGIDFN
 WEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNS
 5 TFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKILGYPPPEIKWYKNGIPLESNHTIKA
 GHVLTIMEVSEKDTGNYTVILTNPISKEKQSHVSVLVVYVPPQIGEKSLISPVDYQYGT
 TQTLTCTVYAI PPPHHIHWYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEV
 NKNQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHVTRGPEITLQPD
 QPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPQPLPIHVGELPTPVCKNLDTLWKLNATMFSN
 10 STNDILIMELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRLTVLERVAPTITGNLENQTT
 IGESIEVSTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTI RRVKEDGLYTCQA
 CSVLGCAKVEAFFIIEGAQEKTNLEIIILVGTAVIAMFFWLLLVIILRTVKRANGGELKT
 GILSIVMDPDELPLDEHCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKT
 ATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFC
 15 KFGNLSTILRSKRNEFVPYKTKGARFRQGDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVE
 EKSLSDVEEEEAPEDLYKDFTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEK
 NVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIF
 SLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMDCWHGEPSQRPTFSELVEH
 LGNLLQANAQQDGKDYIVLPISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNTAG
 20 ISQILQNSKRKSRPVSVKTFEDI PLEPEVKVIPDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLS
 PSFGGMVPSKSRESVASEGSNQTSQYSGYHSDDTDTTVYSSEEAECLKLIEIGVQTGST
 AQILQPDSGTTLSSPPV

Los fármacos anticuerpos contra VEGFR2 pueden bloquear la unión de VEGFR2 y VEGF.

25 Como se usa en la presente, el término “anticuerpo contra VEGFR2” o “anticuerpo anti-VEGFR2” o “anti-VEGFR2 Ab” se refiere a un anticuerpo que se une a VEGFR2, con preferencia al dominio extracelular de VEGFR2.

El anticuerpo tendrá una afinidad de unión suficientemente fuerte para VEGFR2. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a VEGFR2 con un valor K_d de entre
 30 aproximadamente 100 nM y aproximadamente 1 pM. Las afinidades del anticuerpo se pueden determinar mediante, por ejemplo, un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (tal como el ensayo BIAcore se describe en la Publicación de Solicitud PCT N°

WO2005/012359); ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA); y ensayos de competición (por ejemplo, un ensayo de unión a antígeno radiomarcada (RIA)). En una modalidad, K_d se mide mediante un RIA realizado con un Ab anti-VEGFR2, con preferencia ramucirumab.

- 5 En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab es un anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31, y una región variable de una cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32.

- 10 En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab es un anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada (VH) cuya secuencia de aminoácidos es la que se da en la SEQ ID NO: 31, y una región variable de una cadena ligera (VL) cuya secuencia de aminoácidos es la que se da en SEQ ID NO: 32.

(VH; SEQ ID NO: 31)

- 15 EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRF
TISRDNAKNSLILQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTMTVTVSS

(VL; SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGIDNLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNLDTGVPSTRFSGSGSG
TYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK

- 20 En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab es un anticuerpo que comprende una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es la que se da en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es la que se da en SEQ ID NO: 34.

- 25 En algunas modalidades, el anti-VEGFR2 Ab es ramucirumab.

Como se usa en la presente, el término “ramucirumab” también conocido como Cyramza®, IMC–1121b, número de registro CAS 947687–13–0, se refiere a un anti–VEGFR2 Ab que comprende dos cadenas pesadas, cada una de cuyas secuencias de aminoácidos es la que se da en SEQ ID NO: 33 y dos cadenas livianas, cada una de cuyas secuencias de aminoácidos es la que se da en SEQ ID NO: 34.

(Cadena pesada; SEQ ID NO: 33)

```
EVQLVQSGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS ISSSSSYIYY
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARVT DAFDIWGQGT MVTVSSASTK
GPSVLPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS
10 LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKRVEPKSCD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF
LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
```

(Cadena liviana; SEQ ID NO: 34)

```
DIQMTQSPSS VSASIGDRVIT ITCRASQGID NWLGWYQQKP GKAPKLLIYD ASNLDTGVPS
RFGSGSGSTY FTLTISSLQA EDFAVYFCQQ AKAFPTTFGG GTKVDIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
```

El ramucirumab es un anticuerpo monoclonal totalmente humano dirigido contra el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) humano. En el documento WO2003/075840 se describen el ramucirumab y los métodos de fabricación y uso de este compuesto para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, tales como tumores sólidos y no sólidos. Además, también se ha informado la actividad clínica del ramucirumab en pacientes con varios tipos de cáncer.

Como se usa en la presente, el término “DC101” se refiere a un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra VEGFR2 de ratón que se puede usar en experimentos como sustituto en ratones para un Ab anti–VEGFR2, con preferencia ramucirumab. Ver, por ejemplo, Witte L., et al. Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor–2 (F1k1/KDR) as an anti–angiogenic therapeutic strategy. Cancer Metastasis Rev., 17: 155–161, 1998; y/o Prewett M.,

et al., Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. Cancer Res., 59: 5209–5218, 1999.

5 Un anti-VEGFR2 Ab, con preferencia ramucirumab, usualmente es eficaz en un amplio intervalo de dosis en la combinación de la presente invención. Por ejemplo, las dosis por ciclo de tres semanas se sitúan normalmente dentro del intervalo de aproximadamente 6 a 10 mg/kg, con preferencia aproximadamente 8 a aproximadamente 10 mg/kg, y con máxima preferencia aproximadamente 10 mg/kg. En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab, con preferencia ramucirumab, se administra el día uno dentro del intervalo de aproximadamente
10 6 a 10 mg/kg. En algunas modalidades, un anti-VEGFR2 Ab, con preferencia ramucirumab, se administra en el día uno a aproximadamente 10 mg/kg.

Como se usa en la presente, la frase “en combinación con” se refiere a la administración de dos agentes simultánea o secuencialmente en cualquier orden.

15 Un agente de unión biespecífico descrito en la presente se puede administrar a un sujeto simultánea o secuencialmente en cualquier orden con un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano. Por ejemplo, un agente de unión biespecífico se puede administrar antes de la administración de un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano o un agente de unión biespecífico se puede administrar después de la administración de un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano.

20 Inhibidor del punto de control inmunitario

Tal como se utiliza en la presente, el término “punto de control inmunitario” se refiere a los reguladores del sistema inmunitario y, en particular, a las señales coestimuladoras e inhibitoras que regulan la amplitud y la calidad del reconocimiento de un antígeno por parte del receptor de células T. En ciertas modalidades, el punto de control inmunitario es una señal
25 inhibitora. En ciertas modalidades, la señal inhibitora es la interacción entre PD–1 y PD–L1 y/o PD–L2. En ciertas modalidades, la señal inhibitora es la interacción entre CTLA–4 y CD80 o CD86 para desplazar la unión a CD28. En ciertas modalidades, la señal inhibitora es la interacción entre LAG–3 y moléculas MHC de clase II. En ciertas modalidades, la señal inhibitora es la interacción entre TIM–3 y uno o más de sus ligandos, tales como galectina 9,

PtdSer, HMGB1 y CEACAM1. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre uno o varios KIR y sus ligandos. En ciertas modalidades, la señal inhibitoria es la interacción entre TIGIT y uno o más de sus ligandos, PVR, PVRL2 y PVRL3. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre CD94/NKG2A y HLA-E. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre VISTA y sus compañeros de unión. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre uno o más Siglecs y sus ligandos. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre GARP y uno o más de sus ligandos. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre CD47 y SIRPα. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre PVRIG y PVRL2. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre CSF1R y CSF1. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre BTLA y HVEM. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es parte de la vía adenosinérgica, por ejemplo, la interacción entre A2AR y/o A2BR y adenosina, producida por CD39 y CD73. En ciertas modalidades, la señal inhibidora es la interacción entre B7-H3 y su receptor y/o B7-H4 y su receptor. En ciertas modalidades, la señal inhibidora está mediada porIDO, CD20, NOX o TDO.

El receptor “muerte programada 1 (PD-1)” es un receptor inmunoinhibidor perteneciente a la familia CD28. PD-1 se expresa predominantemente en células T previamente activadas *in vivo*, y se une a dos ligandos, PD-L1 (también conocido como B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también conocido como B7-DC o CD273). El término “PD-1”, como se utiliza en la presente, incluye PD-1 humano (hPD-1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-1. El “ligando de muerte programada-1 (PD-L1)” es uno de los dos ligandos de glicoproteína de superficie celular para PD-1 (el otro es PD-L2) que regula por disminución la activación de células T y la secreción de citoquinas después de la unión a PD-1. El término “PD-L1” utilizado en la presente incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-L1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L1. El término “PD-L2” utilizado en la presente incluye PD-L2 humano (hPD-L2), variantes, isoformas y especies homólogas de hPD-L2, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPD-L2. Los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2) se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas o macrófagos, y otras células inmunitarias. La unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2 produce una regulación por disminución de la activación de las células T. Las células cancerosas que expresan PD-L1 y/o PD-L2 son capaces de desactivar las células T que expresan PD-1, lo que provoca la supresión de la respuesta inmunitaria contra el cáncer. La interacción entre PD-1 y sus

ligandos provoca una disminución de los linfocitos infiltrantes en el tumor, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T y una evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas. La supresión inmunitaria se puede revertir mediante la inhibición de la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2.

El “antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)” (también conocido como CD152) es una molécula de superficie de los linfocitos T y es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Esta proteína regula por disminución el sistema inmunitario mediante la unión de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). El término “CTLA-4”, tal como se usa en la presente, incluye CTLA-4 humano (hCTLA-4), variantes, isoformas y especies homólogas de hCTLA-4, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCTLA-4. CTLA-4 es un homólogo de la proteína estimuladora del punto de control CD28 con una afinidad de unión mucho mayor por CD80 y CD86. CTLA4 se expresa en la superficie de las células T activadas y sus ligandos se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales. La unión de CTLA 4 a sus ligandos impide la señal coestimuladora de CD28 y produce una señal inhibidora. De este modo, CTLA-4 regula por disminución la activación de las células T.

El “inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM” (TIGIT, también conocido como WUCAM o Vstm3) es un receptor inmunitario de células T y células citolíticas naturales (NK) que se une a PVR (CD155) en DC, macrófagos, etc., y a PVRL2 (CD112; nectina-2) y PVRL3 (CD113; nectina-3) y regula la inmunidad mediada por células T. El término “TIGIT” como se usa en la presente incluye TIGIT humano (hTIGIT), variantes, isoformas y especies homólogas de hTIGIT, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hTIGIT. El término “PVR” como se usa en la presente incluye PVR humano (hPVR), variantes, isoformas y especies homólogas de hPVR, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPVR. El término “PVRL2” como se usa en la presente incluye PVRL2 humano (hPVRL2), variantes, isoformas y especies homólogas de hPVRL2, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPVRL2. El término “PVRL3” como se usa en la presente incluye PVRL3 humano (hPVRL3), variantes, isoformas y especies homólogas de hPVRL3, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPVRL3.

La “familia B7” se refiere a ligandos inhibidores con receptores indefinidos. La familia B7 abarca B7-H3 y B7-H4, ambos regulados por aumento en células tumorales y células

infiltrantes de tumores. Los términos “B7–H3” y “B7–H4” como se usa en la presente incluyen B7–H3 humano (hB7–H3) y B7–H4 humano (hB7–H4), sus variantes, isoformas y especies homólogas, y análogos que tienen al menos un epítipo común con B7–H3 y B7–H4, respectivamente.

5 El “atenuador de linfocitos B y T” (BTLA, también conocido como CD272) es un miembro de la familia TNFR que se expresa en las células Th1 pero no en las Th2. La expresión de BTLA se induce durante la activación de las células T y se expresa en particular en las superficies de las células T CD8+. El término “BTLA” utilizado en la presente incluye BTLA humano (hBTLA), variantes, isoformas y especies homólogas de hBTLA, y análogos
10 que tienen al menos un epítipo común con hBTLA. La expresión de BTLA se regula por disminución gradualmente durante la diferenciación de las células T CD8+ humanas al fenotipo de células efectoras. Las células T CD8+ humanas específicas de tumores expresan altos niveles de BTLA. BTLA se une al “mediador de entrada de herpesvirus” (HVEM, también conocido como TNFRSF14 o CD270) y participa en la inhibición de células T. El término
15 “HVEM” utilizado en la presente incluye HVEM humano (hHVEM), variantes, isoformas y especies homólogas de hHVEM, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hHVEM. Los complejos BTLA–HVEM regulan negativamente las respuestas inmunitarias de las células T.

Los “receptores tipo inmunoglobulina de células citolíticas” (KIR) son receptores de
20 moléculas MHC de clase I en células T NK y células NK que intervienen en la diferenciación entre células sanas y enfermas. Los KIR se unen a los antígenos leucocitarios humanos (HLA) A, B y C, lo que suprime la activación normal de las células inmunitarias. El término “KIR” como se usa en la presente incluyen KIR humanos (hKIR), variantes, isoformas y especies homólogas de hKIR, y análogos que tienen al menos un epítipo común con a hKIR. El término
25 “HLA” como se usa en la presente incluye variantes, isoformas y especies homólogas de HLA, y análogos que tienen al menos un epítipo común con un HLA. KIR como se usa en la presente en particular se refiere a KIR2DL1, KIR2DL2, y/o KIR2DL3.

“Gen de activación de linfocitos 3 (LAG–3)” (también conocido como CD223) es un receptor inhibidor asociado a la inhibición de la actividad linfocitaria mediante la unión a
30 moléculas MHC de clase II. Este receptor potencia la función de las células Treg e inhibe la función de las células T efectoras CD8+, lo que conduce a la supresión de la respuesta

inmunitaria. LAG-3 se expresa en células T activadas, células NK, células B y DC. El término “LAG-3” utilizado en la presente incluye LAG-3 humano (hLAG-3), variantes, isoformas y especies homólogas de hLAG-3, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

La “proteína de membrana de células T-3 (TIM-3)” (también conocida como HAVcr-2) es un receptor inhibidor implicado en la inhibición de la actividad linfocitaria mediante la inhibición de las respuestas de las células Th1. Su ligando es la galectina 9 (GAL9), que está regulada por aumento en varios tipos de cáncer. Otros ligandos de TIM-3 incluyen fosfatidilserina (PtdSer), proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) y molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1). El término “TIM-3” como se usa en la presente incluye TIM3 humano (hTIM-3), variantes, isoformas y especies homólogas de hTIM-3, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “GAL9” como se usa en la presente incluye GAL9 humano (hGAL9), variantes, isoformas y especies homólogas de hGAL9, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “PtdSer” como se usa en la presente incluye variantes y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “HMGB1” como se usa en la presente incluye HMGB1 humano (hHMGB1), variantes, isoformas y especies homólogas de hHMGB1, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “CEACAM1” como se usa en la presente incluye CEACAM1 humano (hCEACAM1), variantes, isoformas y especies homólogas de hCEACAM1, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

“CD94/NKG2A” es un receptor inhibidor que se expresa predominantemente en la superficie de las células citolíticas naturales y las células T CD8+. El término “CD94/NKG2A” como se usa en la presente incluye CD94/NKG2A humano (hCD94/NKG2A), variantes, isoformas y especies homólogas de hCD94/NKG2A, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El receptor CD94/NKG2A es un heterodímero que comprende CD94 y NKG2A. Suprime la activación de las células NK y la función de las células T CD8+, probablemente mediante la unión a ligandos tales como HLA-E. CD94/NKG2A restringe la liberación de citoquinas y la respuesta citotóxica de las células citolíticas naturales (células NK), las células T citolíticas naturales (células NK-T) y las células T (α/β y γ/δ). NKG2A se expresa con frecuencia en células infiltrantes de tumores y HLA-E se sobreexpresa en varios tipos de cáncer.

La “indolamina 2,3-dioxigenasa” (IDO) es una enzima catabólica del triptófano con

propiedades inmunoinhibidoras. El término “IDO”, tal como se utiliza en la presente, incluye la IDO humana (hIDO), las variantes, isoformas y especies homólogas de la hIDO, y los análogos que tienen al menos un epítipo común. La IDO es la enzima que limita la velocidad de degradación del triptófano catalizando su conversión en quinurenina. Por lo tanto, la IDO está
5 implicada en la reducción de aminoácidos esenciales. Se sabe que está implicada en la supresión de células T y NK, la generación y activación de Tregs y células supresoras derivadas de mieloides, y la promoción de la angiogénesis tumoral. La IDO se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer y se ha demostrado que promueve el escape del sistema inmunitario de las células tumorales y facilita la progresión tumoral crónica cuando es inducida
10 por una inflamación local.

En la “vía adenosinérgica” o “vía de señalización de la adenosina”, tal como se usa en la presente, el ATP se convierte a adenosina mediante las ectonucleotidasas CD39 y CD73, lo que produce la señalización inhibitoria a través de la unión de la adenosina por uno o más de los receptores inhibidores de adenosina “Receptor de Adenosina A2A” (A2AR, también
15 conocido como ADORA2A) y “Receptor de Adenosina A2B” (A2BR, también conocido como ADORA2B). La adenosina es un nucleósido con propiedades inmunosupresoras y está presente en altas concentraciones en el microambiente tumoral, lo que restringe la infiltración de células inmunitarias, la citotoxicidad y la producción de citoquinas. En consecuencia, la señalización por adenosina es una estrategia de las células cancerosas para evitar la
20 eliminación del sistema inmunitario del huésped. La señalización de adenosina a través de A2AR y A2BR es un importante punto de control en la terapia del cáncer que se activa por las altas concentraciones de adenosina típicamente presentes en el microambiente tumoral. CD39, CD73, A2AR y A2BR se expresan en la mayoría de las células inmunitarias, que incluye células T, células citolíticas naturales invariantes, células B, plaquetas, mastocitos y
25 eosinófilos. La señalización de la adenosina a través de A2AR y A2BR contrarresta la activación de las células inmunitarias mediada por receptores de células T y provoca un aumento del número de Tregs y una disminución de la activación de DC y células T efectoras. El término “CD39” como se usa en la presente incluye CD3 humano9 (hCD39), variantes, isoformas y especies homólogas de hCD39, y análogos que tienen al menos un epítipo
30 común. El término “CD73” como se usa en la presente incluye CD73 humano (hCD73), variantes, isoformas y especies homólogas de hCD73, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “A2AR” como se usa en la presente incluye A2AR humano (hA2AR), variantes, isoformas y especies homólogas de hA2AR, y análogos que tienen al menos un epítipo común. El término “A2BR” como se usa en la presente incluye A2BR humano (hA2BR),

variantes, isoformas y especies homólogas de hA2BR, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

5 El “supresor Ig del dominio V de la activación de células T” (VISTA, también conocido como C10orf54) tiene homología con PD–L1 pero muestra un patrón de expresión único restringido al compartimento hematopoyético. El término “VISTA” utilizado en la presente incluye VISTA humano (hVISTA), variantes, isoformas y especies homólogas de hVISTA, y análogos que tienen al menos un epítipo común. VISTA induce la supresión de células T y se expresa en los leucocitos dentro de tumores.

10 Los miembros de la familia “lectina de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico” (Siglec) reconocen los ácidos siálicos y participan en la distinción entre “propio” y “no propio”. El término “Siglecs” como se usa en la presente incluye Siglecs humanas (hSiglecs), variantes, isoformas y especies homólogas de hSiglecs, y análogos que tienen al menos un epítipo común con una o más hSiglecs. El genoma humano contiene 14 Siglecs de las cuales varias están implicadas en la inmunosupresión, que incluyen sin limitación, Siglec–2, Siglec–3,
15 Siglec–7 y Siglec–9. Los receptores Siglec se unen a glicanos que contienen ácido siálico, pero difieren en su reconocimiento de la regioquímica de enlace y la distribución espacial de los residuos siálicos. Los miembros de la familia también tienen patrones de expresión distintos. Una amplia gama de neoplasias malignas sobreexpresan uno o más Siglecs.

20 El “CD20” es un antígeno que se expresa en la superficie de las células B y T. Se puede hallar una expresión elevada de CD20 en cánceres, tales como linfomas de células B, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica de células B y células madre del cáncer de melanoma. El término “CD20”, tal como se utiliza en la presente, incluye CD20 humano (hCD20), variantes, isoformas y especies homólogas de hCD20, y análogos que tienen al menos un epítipo común.

25 “Glicoproteína A predominante en repeticiones” (GARP) desempeña un papel en la tolerancia inmunitaria y en la capacidad de los tumores de escapar al sistema inmunitario del paciente. El término “GARP”, tal como se utiliza en la presente, incluye GARP humana (hGARP), variantes, isoformas y especies homólogas de hGARP, y análogos que tengan al menos un epítipo común. La GARP se expresa en linfocitos, incluidas las células Treg de la
30 sangre periférica y las células T infiltradas en tumores. Probablemente se une al “factor de

crecimiento transformante β " (TGF- β) latente. La alteración de la señalización GARP en las Tregs provoca una disminución de la tolerancia e inhibe la migración de las Tregs al intestino y el aumento de la proliferación de células T citotóxicas.

5 "CD47" es una proteína de transmembrana que se une al ligando "proteína alfa reguladora de señala" (SIRP α). El término "CD47" como se usa en la presente incluye CD47 humano (hCD47), variantes, isoformas y especies homólogas de hCD47, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCD47. El término "SIRP α " como se usa en la presente incluye SIRP α humano (hSIRP α), variantes, isoformas y especies homólogas de hSIRP α , y análogos que tienen al menos un epítipo común con hSIRP α . La señalización de CD47
10 interviene en diversos procesos celulares, que incluyen apoptosis, proliferación, adhesión y migración. CD47 se sobreexpresa en muchos cánceres y funciona como señal de "no me comas" para los macrófagos. El bloqueo de la señalización de CD47 mediante anticuerpos inhibidores anti-CD47 o anti-SIRP α permite la fagocitosis de las células cancerosas por los macrófagos y favorece la activación de los linfocitos T específicos del cáncer.

15 "Que contiene dominio de inmunoglobulina relacionada con receptor del poliovirus" (PVRIG, también conocido como CD112R) se une a "Relacionado con el receptor de poliovirus 2" (PVRL2). PVRIG y PVRL2 se sobreexpresan en varios tipos de cáncer. La expresión de PVRIG también induce la expresión de TIGIT y PD-1, y PVRL2 y PVR (un ligando de TIGIT) se coexpresan en varios tipos de cáncer. El bloqueo de la vía de señalización PVRIG produce
20 un aumento de la función de las células T y de las respuestas de las células T CD8+ y, por tanto, una reducción de la inmunosupresión y un aumento de las respuestas al interferón. El término "PVRIG" como se usa en la presente incluye PVRIG humano (hPVRIG), variantes, isoformas y especies homólogas de hPVRIG, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hPVRIG. "PVRL2" como se usa en la presente incluye hPVRL2, como se definió
25 anteriormente.

La vía del "factor estimulante de colonias 1" es otro punto de control al que puede dirigirse de acuerdo con la descripción. El CSF1R es un receptor del factor de crecimiento mielóide que se une al CSF1. El bloqueo de la señalización CSF1R puede reprogramar funcionalmente las respuestas de los macrófagos, así se mejora la presentación de antígenos
30 y las respuestas de las células T antitumorales. El término "CSF1R" como se usa en la presente incluye CSF1R humano (hCSF1R), variantes, isoformas y especies homólogas de

hCSF1R, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCSF1R. El término “CSF1” como se usa en la presente incluye CSF1 humano (hCSF1), variantes, isoformas y especies homólogas de hCSF1, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCSF1.

5 “Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADPH oxidasa” se refiere a una enzima de la familia NOX de enzimas de células mieloides que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) inmunosupresoras. Se ha descubierto que cinco enzimas NOX (NOX1 a NOX5) están implicadas en el desarrollo del cáncer y la inmunosupresión. Se han detectado niveles elevados de ROS en casi todos los cánceres y favorecen muchos aspectos del desarrollo y la progresión tumoral. Las ROS producidas por NOX amortiguan las funciones de las células NK y T, y la inhibición de NOX en las células mieloides mejora las funciones antitumorales de las células NK y T adyacentes. El término “NOX” utilizado en la presente incluye NOX humano (hNOX), variantes, isoformas y especies homólogas de hNOX, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hNOX.

15 Otro punto de control inmunitario al que puede dirigirse la sustancia de acuerdo con la descripción es la señal mediada por la “triptófano–2,3–dioxigenasa” (TDO). La TDO representa una ruta alternativa a la IDO en la degradación del triptófano y está implicada en la supresión inmunitaria. Debido a que las células tumorales pueden catabolizar el triptófano a través de la TDO en lugar de la IDO, la TDO puede representar una diana adicional para el bloqueo de los puntos de control. En efecto, se ha observado que varias líneas celulares cancerosas regulan por aumento la TDO y la TDO puede complementar la inhibición de la IDO. El término “TDO” utilizado en la presente incluye la TDO humana (hTDO), las variantes, isoformas y especies homólogas de la hTDO, y los análogos que tengan al menos un epítipo común con la hTDO.

25 Muchos de los puntos de control inmunitario están regulados por interacciones entre pares específicos de receptor y ligando, tal como los descritos anteriormente. Así, las proteínas de los puntos de control inmunitario median la señalización de los puntos de control inmunitario. Por ejemplo, las proteínas de los puntos de control regulan directa o indirectamente la activación, proliferación y/o función de las células T. Las células cancerosas a menudo explotan estas vías de puntos de control para protegerse de ser atacadas por el sistema inmunitario. Por lo tanto, la función de las proteínas de punto de control, que se modula de acuerdo con la presente descripción es típicamente la regulación de la activación

de células T, la proliferación de células T y/o la función de células T. De este modo, las proteínas de punto de control inmunitario regulan y mantienen la autotolerancia y la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas. Muchas de las proteínas de punto de control inmunitario pertenecen a la familia B7:CD28 o a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y, al unirse a ligandos específicos, activan moléculas de señalización que se reclutan en el dominio citoplasmático (Suzuki et al., 2016, Jap J Clin Onc, 46:191–203).

Como se usa en la presente, el término “modulador de puntos de control inmunitario” o “modulador de puntos de control” se refiere a una molécula o a un compuesto que modula la función de una o más proteínas de puntos de control. Los moduladores de puntos de control inmunitario normalmente son capaces de modular la autotolerancia y/o la amplitud y/o la duración de la respuesta inmunitaria. Con preferencia, el modulador de puntos de control inmunitario utilizado de acuerdo con la presente descripción modula la función de una o más proteínas de puntos de control humanas y es, por tanto, un “modulador de puntos de control humanos”. En una modalidad preferida, el modulador de puntos de control humano utilizado en la presente es un inhibidor de puntos de control inmunitario.

Como se usa en la presente, “inhibidor de puntos de control inmunitario” o “inhibidor de puntos de control” se refiere a una molécula que reduce, inhibe, interfiere o modula negativamente, total o parcialmente, una o más proteínas de puntos de control o que reduce, inhibe, interfiere o modula negativamente, total o parcialmente, la expresión de una o más proteínas de puntos de control. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario se une a una o más proteínas del punto de control. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario se une a una o más moléculas que regulan las proteínas del punto de control. En ciertas modalidades, el inhibidor de puntos de control inmunitario se une a precursores de una o más proteínas de puntos de control, por ejemplo, a nivel de ADN o ARN. Se puede utilizar cualquier agente que funcione como inhibidor de puntos de control de acuerdo con la presente descripción.

El término “parcialmente” como se usa en la presente significa al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % del nivel, por ejemplo, del nivel de inhibición de una proteína del punto de control.

En ciertas modalidades, el inhibidor de puntos de control inmunitario adecuado para su uso en la presente es un antagonista de señales inhibitorias, por ejemplo, un anticuerpo dirigido, por ejemplo, a PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3, B7-H3, B7-H4 o TIM-3. Estos ligandos y receptores se revisan en Pardoll, D. *Nature*, 12: 252-264, 2012. En la presente se describen otras proteínas de punto de control inmunitario a las que puede dirigirse la descripción.

En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide las señales inhibitorias asociadas con el punto de control inmunitario. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo o fragmento del mismo que interrumpe la señalización inhibitoria asociada con el punto de control inmunitario. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor de molécula pequeña que interrumpe la señalización inhibitoria. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un inhibidor basado en péptidos que interrumpe la señalización inhibitoria. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es una molécula de ácido nucleico inhibidora que interrumpe la señalización inhibidora.

En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento del mismo, o imitador de anticuerpo, que impide la interacción entre las proteínas del bloqueador del punto de control, por ejemplo, anticuerpo o fragmento del mismo que impide la interacción entre PD-1 y PD-L1 o PD-L2. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento del mismo, o imitador de anticuerpo, que impide la interacción entre CTLA-4 y CD80 o CD86. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento del mismo, o imitador de anticuerpo, que impide la interacción entre LAG-3 y sus ligandos, o TIM-3 y sus ligandos. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la señalización inhibidora a través de CD39 y/o CD73 y/o la interacción de A2AR y/o A2BR con adenosina. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de B7-H3 con su receptor y/o de B7-H4 con su receptor. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de BTLA con su ligando HVEM. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de uno o más KIR con sus respectivos ligandos. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de LAG-3 con uno o más de sus ligandos. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de TIM-3 con uno o más de sus ligandos Galectin-9, PtdSer, HMGB1 y CEACAM1. En ciertas modalidades,

el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de TIGIT con uno o más de sus ligandos PVR, PVRL2 y PVRL3. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de CD94/NKG2A con HLA-E. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de VISTA con uno o más de sus compañeros de unión. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de uno o más Siglecs y sus respectivos ligandos. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la señalización de CD20. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de GARP con uno o más de sus ligandos. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de CD47 con SIRP α . En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de PVRIG con PVRL2. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la interacción de CSF1R con CSF1. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la señalización de NOX. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario impide la señalización de IDO y/o TDO.

La inhibición o el bloqueo de la señalización inhibidora de puntos de control inmunitario, como se describe en la presente, producen la prevención o la inversión de la inmunosupresión y el establecimiento o la mejora de la inmunidad de células T contra las células cancerosas. En una modalidad, la inhibición de la señalización de puntos de control inmunitario, como se describe en la presente, reduce o inhibe la disfunción del sistema inmunitario. En una modalidad, la inhibición de la señalización de puntos de control inmunitario, como se describe en la presente, hace que las células inmunitarias disfuncionales sean menos disfuncionales. En una modalidad, la inhibición de la señalización de puntos de control inmunitario, como se describe en la presente, hace que una célula T disfuncional sea menos disfuncional.

El término “disfunción”, como se utiliza en la presente, se refiere a un estado de respuesta inmunitaria reducida a la estimulación antigénica. El término incluye los elementos comunes de agotamiento y/o anergia en los que se puede producir el reconocimiento del antígeno, pero la respuesta inmunitaria resultante es ineficaz para controlar la infección o el crecimiento tumoral. La disfunción también incluye un estado en el que el reconocimiento del antígeno se retrasa debido a células inmunitarias disfuncionales.

El término “disfuncional”, tal como se usa en la presente, se refiere a una célula

inmunitaria que se encuentra en un estado de respuesta inmunitaria reducida a la estimulación del antígeno. Disfuncional incluye la falta de respuesta al reconocimiento del antígeno y el deterioro de la capacidad para traducir el reconocimiento del antígeno en funciones efectoras de células T corriente abajo, tal como la proliferación, producción de citoquinas (por ejemplo, IL-2) y/o destrucción de células diana.

El término “anergia”, tal como se usa en la presente, se refiere al estado de falta de respuesta a la estimulación por antígenos resultante de señales incompletas o insuficientes transmitidas a través del receptor de células T (TCR). La anergia de las células T también se puede producir después de la estimulación con antígeno en ausencia de coestimulación, lo que provoca que la célula se vuelva refractaria a la activación posterior por el antígeno incluso en el contexto de la coestimulación. A menudo, este estado de falta de respuesta puede ser anulado por la presencia de IL-2. Las células T anérgicas no experimentan una expansión clonal ni adquieren funciones efectoras.

El término “agotamiento”, tal como se usa en la presente, se refiere al agotamiento de las células inmunitarias, tal como el agotamiento de las células T como un estado de disfunción de las células T que surge de la señalización sostenida del TCR que se produce durante muchas infecciones crónicas y cáncer. Se distingue de la anergia en que no se produce por una señalización incompleta o deficiente, sino por una señalización sostenida. El agotamiento se define por una función efectora deficiente, la expresión sostenida de receptores inhibidores y un estado transcripcional distinto del de las células T efectoras funcionales o de memoria. El agotamiento impide el control óptimo de las enfermedades (por ejemplo, infecciones y tumores). El agotamiento puede ser el resultado tanto de vías reguladoras negativas extrínsecas (por ejemplo, citoquinas inmunorreguladoras) como de vías reguladoras negativas intrínsecas de la célula (vías inhibidoras de puntos de control inmunitario, tal como las descritas en la presente).

“Mejorar la función de las células T” significa inducir, provocar o estimular una célula T para que tenga una función biológica sostenida o amplificada, o renovar o reactivar células T agotadas o inactivas. Entre los ejemplos de mejora de la función de las células T se incluyen el aumento de la secreción de γ -interferón de las células T CD8+, aumento de la proliferación, aumento de la capacidad de respuesta a antígenos (por ejemplo, eliminación de tumores) en relación con los niveles anteriores a la intervención. En una modalidad, el nivel de mejora es

de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 200 %, o más. Las formas de medir este aumento son conocidas por los expertos en la técnica.

El inhibidor del punto de control inmunitario puede ser una molécula de ácido nucleico inhibidora. El término “ácido nucleico inhibidor” o “molécula de ácido nucleico inhibidora”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, ADN o ARN, que reduce, inhibe, interfiere o modula negativamente, total o parcialmente una o más proteínas del punto de control. Las moléculas de ácido nucleico inhibidoras incluyen, sin limitación, oligonucleótidos, ARNsi, ARNsh, moléculas de ADN o ARN antisentido y aptámeros (por ejemplo, aptámeros de ADN o ARN).

El término “oligonucleótido”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de disminuir la expresión de proteínas, en particular la expresión de una proteína de punto de control, tal como las proteínas de punto de control descritas en la presente. Los oligonucleótidos son moléculas de ADN o ARN cortos, que típicamente comprenden de 2 a 50 nucleótidos. Los oligonucleótidos pueden ser de cadena simple o cadena doble. Un oligonucleótido inhibidor del punto de control puede ser un oligonucleótido antisentido. Los oligonucleótidos antisentido son moléculas de ADN o ARN de cadena simple complementarias a una secuencia determinada, en particular a una secuencia de ácido nucleico (o un fragmento de la misma) de una proteína de punto de control. El ARN antisentido se utiliza normalmente para impedir la traducción de proteína del ARNm, por ejemplo, del ARNm que codifica una proteína de punto de control, mediante la unión a dicho ARNm. El ADN antisentido se utiliza normalmente para dirigirse a un ARN específico complementario (codificador o no codificador). Si se produce la unión, dicho híbrido ADN/ARN puede ser degradado por la enzima ARNasa H. Además, los oligonucleótidos antisentido morfolino se pueden utilizar para el knockdown de genes en vertebrados. Por ejemplo, Kryczek et al., 2006 (J Exp Med, 203:871–81) diseñaron morfolinos específicos de B7–H4 que bloquearon específicamente la expresión de B7–H4 en macrófagos, lo que produjo un aumento de la proliferación de células T y una reducción de los volúmenes tumorales en ratones con células T específicas de antígenos asociados a tumores (TAA).

Los términos “ARNsi” o “ARN pequeño de interferencia” o “ARN pequeño inhibidor” se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a una molécula de ARN de cadena doble

con una longitud típica de 20–25 pares de bases que interfiere en la expresión de un gen específico, tal como un gen que codifica una proteína de punto de control, con una secuencia de nucleótidos complementaria. En una modalidad, el ARNsi interfiere el ARNm, de este modo se bloquea la traducción, por ejemplo, la traducción de una proteína de punto de control inmunitario. La transfección de ARNsi exógeno se puede utilizar para el knockdown génico; sin embargo, el efecto puede ser solo transitorio, especialmente en células que se dividen rápidamente. La transfección estable se puede conseguir, por ejemplo, mediante la modificación del ARN o utilizando un vector de expresión. Se conocen en la técnica modificaciones y vectores útiles para la transfección estable de células con ARNsi. Las secuencias de ARNsi también se pueden modificar para introducir un bucle corto entre las dos cadenas, lo que da como resultado un “ARN de horquilla pequeña” o “ARNsh”. El ARNsh se puede procesar en un ARNsh funcional mediante Dicer. Por consiguiente, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un ARNsh.

El término “aptámero”, tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple, tal como ADN o ARN, normalmente de una longitud de 25–70 nucleótidos, capaz de unirse a una molécula diana, tal como un polipéptido. En una modalidad, el aptámero se une a una proteína de punto de control inmunitario, tal como las proteínas de punto de control inmunitario descritas en la presente. Por ejemplo, un aptámero de acuerdo con la descripción se puede unir específicamente a una proteína o polipéptido de punto de control inmunitario, o a una molécula en una vía de señalización que modula la expresión de una proteína o polipéptido de punto de control inmunitario. La generación y el uso terapéutico de aptámeros son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, US 5,475,096).

Los términos “inhibidor de molécula pequeña” o “molécula pequeña” se utilizan indistintamente en la presente y se refieren a un compuesto orgánico de bajo peso molecular, normalmente de hasta 1000 daltons, que reduce, inhibe, interfiere o modula negativamente, total o parcialmente, una o más proteínas de punto de control, tal como se describió anteriormente. Tales inhibidores de moléculas pequeñas normalmente se sintetizan mediante química orgánica, pero también se pueden aislar de fuentes naturales, tales como plantas, hongos y microbios. El pequeño peso molecular permite que un inhibidor de molécula pequeña se difunda rápidamente a través de las membranas celulares. Por ejemplo, varios antagonistas A2AR conocidos en la técnica son compuestos orgánicos con un peso molecular inferior a 500 daltons.

El inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno del mismo, un imitador de anticuerpo o una proteína de fusión que comprende una porción de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida. Los anticuerpos o sus fragmentos de unión a antígeno se describen en la presente. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que son inhibidores de puntos de control inmunitario incluyen, en particular, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a proteínas de puntos de control inmunitario, tales como receptores de puntos de control inmunitario o ligandos de receptores de puntos de control inmunitario. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también se pueden conjugar con otras moléculas, como se describe en la presente. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos quimerizados, humanizados o humanos. Con preferencia, los anticuerpos inhibidores de puntos de control inmunitario o sus fragmentos de unión a antígeno son antagonistas de receptores de puntos de control inmunitario o de ligandos de receptores de puntos de control inmunitario.

En una modalidad preferida, el anticuerpo inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo aislado.

El anticuerpo que es un inhibidor del punto de control inmunitario o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente descripción también puede ser un anticuerpo que compite de forma cruzada por la unión a antígeno con cualquier anticuerpo inhibidor del punto de control inmunitario conocido. En ciertas modalidades, un anticuerpo inhibidor del punto de control inmunitario compite de forma cruzada con uno o más de los anticuerpos inhibidores del punto de control inmunitario descritos en la presente. La capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada por la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos se pueden unir a la misma región epitópica del antígeno o cuando se unen a otro epítipo impiden estéricamente la unión de anticuerpos inhibidores de puntos de control inmunitario conocidos a esa región epitópica particular. Estos anticuerpos de competición cruzada pueden tener propiedades funcionales muy similares a las de aquellos con los que compiten en forma cruzada, ya que se espera que bloqueen la unión del punto de control inmunitario a su ligando, ya sea mediante la unión al mismo epítipo o mediante el impedimento estérico de la unión del ligando. Los anticuerpos de competición cruzada se pueden identificar fácilmente sobre la base de su capacidad de competición cruzada con uno o más anticuerpos conocidos en ensayos de unión estándar tales como el análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayos ELISA o citometría de flujo (ver, por

ejemplo, WO 2013/173223).

En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten de forma cruzada por la unión a un antígeno dado con, o se unen a la misma región epitópica de un antígeno dado que, uno o más anticuerpos conocidos son anticuerpos monoclonales. Para la administración a pacientes humanos, estos anticuerpos de competición cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o anticuerpos humanizados o humanos. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por métodos bien conocidos en la técnica.

El inhibidor del punto de control también puede estar en forma de la forma soluble de las moléculas mismas (o variantes de las mismas), por ejemplo, una fusión soluble de PD-L1 o PD-L1.

En el contexto de la descripción, puede usarse más de un inhibidor de puntos de control, en el que los más de un inhibidores de puntos de control se dirigen a vías de puntos de control distintas o a la misma vía de puntos de control. Con preferencia, los más de un inhibidor de puntos de control son inhibidores de puntos de control distinto. Con preferencia, si se usa más de un inhibidor de puntos de control distinto, en particular se usan al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 inhibidores de puntos de control distintos, con preferencia se usan 2, 3, 4 o 5 inhibidores de puntos de control distintos, con más preferencia se usan 2, 3 o 4 inhibidores de puntos de control distintos, incluso con más preferencia se usan 2 o 3 inhibidores de puntos de control distintos y con máxima preferencia se usan 2 inhibidores de puntos de control distintos. Los ejemplos preferidos de combinaciones de inhibidores de puntos de control distintos incluyen la combinación de un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de CTLA-4, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de TIGIT, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de B7-H3 y/o B7-H4, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de BTLA, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de KIR, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de LAG-3, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de TIM-3, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de CD94/NKG2A, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización deIDO, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de adenosina, un inhibidor de la

señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de VISTA, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de Siglec, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de CD20, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de GARP, un inhibidor de la
5 señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de CD47, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de PVRIG, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de CSF1R, un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de NOX, y un inhibidor de la señalización de PD-1 y un inhibidor de la señalización de TDO.

10 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor (bloqueador del punto de control inmunitario) es un componente de la vía de señalización PD-1/PD-L1 o PD-1/PD-L2. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de puntos de control de la vía de señalización PD-1. En ciertas modalidades, el inhibidor de puntos de control es un componente de la vía de señalización
15 PD-1/PD-L1 o PD-1/PD-L2. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización PD-1 es un inhibidor de PD-1. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de PD-1 es un inhibidor del ligando PD-1, tal como un inhibidor de PD-L1 o un inhibidor de PD-L2. En una modalidad preferida, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de PD-1 es un anticuerpo o una porción de unión
20 a antígeno del mismo que interrumpe la interacción entre el receptor PD-1 y uno o más de sus ligandos, PD-L1 y/o PD-L2. Los anticuerpos que se unen a PD-1 e interrumpen la interacción entre PD-1 y uno o más de sus ligandos son conocidos en la técnica. En ciertas modalidades, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-1. En ciertas modalidades, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se
25 une específicamente a PD-L1 e inhibe su interacción con PD-1, de este modo aumenta la actividad inmunitaria. En ciertas modalidades, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PD-L2 e inhibe su interacción con PD-1, de este modo aumenta la actividad inmunitaria.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de
30 señalización CTLA-4. En consecuencia, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización CTLA-4. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control de la vía de señalización CTLA-4 es un inhibidor de CTLA-4. En ciertas modalidades, el inhibidor del

punto de control de la vía de señalización CTLA-4 es un inhibidor del ligando CTLA-4.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización TIGIT. En consecuencia, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización TIGIT. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control de la vía de señalización de TIGIT es un inhibidor de TIGIT. En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control de la vía de señalización de TIGIT es un inhibidor del ligando de TIGIT.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de la familia B7. En ciertas modalidades, los miembros de la familia B7 son B7-H3 y B7-H4. Ciertas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de B7-H3 y/o B7-H4. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se dirige a B7-H3 o B7-H4. La familia B7 no tiene receptores definidos, pero estos ligandos están regulados por aumento en las células tumorales o en las células que infiltran el tumor. Los modelos preclínicos de ratón han demostrado que el bloqueo de estos ligandos puede aumentar la inmunidad antitumoral.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de BTLA. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de BTLA. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de BTLA es un inhibidor de BTLA. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de BTLA es un inhibidor de HVEM.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de una o más vías de señalización de KIR. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de uno o más vías de señalización de KIR. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de uno o más vías de señalización de KIR es un inhibidor de KIR. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de una o más vías de señalización de KIR es un inhibidor del ligando de KIR. Por ejemplo, el inhibidor de KIR de acuerdo con la presente descripción puede ser un anticuerpo anti-KIR que se une a KIR2DL1, KIR2DL2, y/o KIR2DL3.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de LAG-3. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la señalización de LAG-3. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de LAG-3 es un inhibidor de LAG-3. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de LAG-3 es un inhibidor del ligando de LAG-3

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de TIM-3. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de TIM-3. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de TIM-3 es un inhibidor de TIM-3. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de TIM-3 es un inhibidor del ligando de TIM-3.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de CD94/NKG2A. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD94/NKG2A. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD94/NKG2A es un inhibidor de CD94/NKG2A. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD94/NKG2A es un inhibidor del ligando de CD94/NKG2A.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de IDO. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de IDO, por ejemplo, un inhibidor de IDO.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de adenosina. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de adenosina. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de adenosina es un inhibidor de CD39. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de adenosina es un inhibidor de CD73. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de adenosina es un

inhibidor de A2AR. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de adenosina es un inhibidor de A2BR.

5 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de VISTA. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de VISTA. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de VISTA es un inhibidor de VISTA.

10 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de una o más vías de señalización de Siglec. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de una o más vías de señalización de Siglec. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de una o más vías de señalización de Siglec es un inhibidor de Siglec. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de una o más vías de señalización de Siglec es un inhibidor del ligando de Siglec.

15 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de CD20. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD20. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD20 es un inhibidor de CD20.

20 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de GARP. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de GARP. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de GARP es un inhibidor de GARP.

25 En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de CD47. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD47. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CD47 es un inhibidor de CD47. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto

de control de la vía de señalización de CD47 es un inhibidor del ligando de SIRP α .

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de PVRIG. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de
5 señalización de PVRIG. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de PVRIG es un inhibidor de PVRIG. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de PVRIG es un inhibidor del ligando de PVRIG.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de señalización de CSF1R. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción
10 proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CSF1R. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CSF1R es un inhibidor de CSF1R. En ciertas modalidades, el inhibidor de punto de control de la vía de señalización de CSF1R es un inhibidor de CSF1,

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de
15 señalización de NOX. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de NOX, por ejemplo, un inhibidor de NOX.

En ciertas modalidades, el inmunorregulador inhibidor es un componente de la vía de
20 señalización de TDO. Por consiguiente, determinadas modalidades de la descripción proporcionan la administración a un sujeto de un inhibidor de punto de control de la vía de señalización de TDO, por ejemplo, un inhibidor de TDO.

Los ejemplos de inhibidores de PD-1 incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-PD-1 tales como BGB-A317 (BeiGene; ver US 8,735,553, WO 2015/35606 y US 2015/0079109), cemiplimab (Regeneron; ver WO 2015/112800) y lambrolizumab (por ejemplo, descrito como
25 hPD109A y sus derivados humanizados h409A1, h409A16 y h409A17 en WO2008/156712), AB137132 (Abcam), EH12,2H7 y RMP1-14 (#BE0146; Bioxcell Lifesciences Pvt. LTD.), MIH4 (Affymetrix eBioscience), nivolumab (OPDIVO, BMS-936558; Bristol Myers Squibb; ver WO 2006/121168), pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475; Merck; ver WO 2008/156712), pidilizumab (CT-011; CureTech; ver Hardy et al., 1994, Cancer Res., 54(22):5793-6 y WO

2009/101611), PDR001 (Novartis; ver WO 2015/112900), MEDI0680 (AMP-514; AstraZeneca; ver WO 2012/145493), TSR-042 (ver WO 2014/179664), REGN-2810 (H4H7798N; consultar US 2015/0203579), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; ver Si-Yang Liu et al., 2007, J. Hematol. Oncol. 70: 136), AMP-224 (GSK-2661380; consultar Li et al., 2016, Int J Mol Sci 5 17(7):1151 y WO 2010/027827 y WO 2011/066342), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (BeiGene; ver WO 2015/35606 y US 2015/0079109), BI 754091, sintilimab (IBI308), camrelizumab (SHR-1210) (ver WO2015/085847), y anticuerpo 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3, y 5F4 como se describe en WO 2006/121168, INCSHR1210 (Jiangsu Hengrui Medicine; también conocido como camrelizumab (SHR-1210); ver WO 2015/085847), TSR-042 (Tesaro 10 Biopharmaceutical; también conocido como ANB011; ver WO2014/179664), GLS-010 (Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; también conocido como WBP3055; ver Si-Yang et al., 2017, J. Hematol. Oncol. 70: 136), STI-1110 (Sorrento Therapeutics; ver WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; ver WO 2017/040790), MGA012 (MacroGenics; ver WO 2017/19846), IBI308 (Innovent; ver WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/132825, y WO 15 2017/133540), anticuerpos anti-PD-1 descritos, por ejemplo, en US 7,488,802, US 8,008,449, US 8,168,757, WO 03/042402, WO 2010/089411 (también se describen anticuerpos anti-PD-L1), WO 2010/036959, WO 2011/159877 (también se describen anticuerpos contra TIM-3), WO 2011/082400, WO 2011/161699, WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2012/145493 (también se describen anticuerpos contra PD-L1), WO 2015/035606, WO 20 2014/055648 (también se describen anticuerpos anti-KIR), US 2018/0185482 (también se describen anticuerpos anti-PD-L1 y anti-TIGIT), US 8,008,449, US 8,779,105, US 6,808,710, US 8,168,757, US 2016/0272708, y US 8,354,509, antagonistas de moléculas pequeñas de la vía de señalización de PD-1 descritos, por ejemplo, en Shaabani et al., 2018, Expert Op Ther Pat., 28(9):665-678 y Sasikumar and Ramachandra, 2018, BioDrugs, 32(5):481-497, los 25 ARNs dirigidos a PD-1 descritos, por ejemplo, en WO 2019/000146 y WO 2018/103501, proteínas solubles de PD-1 descritas en WO 2018/222711 y virus oncolíticos que comprenden una forma soluble de PD-1 como se describe, por ejemplo, en WO 2018/022831.

En una cierta modalidad, el inhibidor de PD-1 es nivolumab (OPDIVO; BMS-936558), pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011), PDR001, MEDI0680 (AMP- 30 514), TSR-042, REGN2810, JS001, AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, BGB-A317, BI 754091, sintilimab (IBI308), o camrelizumab (SHR-1210).

Los ejemplos de inhibidores del ligando de PD-1 son los inhibidores de PD-L1 y los inhibidores de PD-L2 e incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-PD-L1 tales como MEDI4736

(durvalumab; AstraZeneca; ver WO 2011/066389), MSB-0010718C (ver US 2014/0341917), YW243,55.S70 (ver SEQ ID NO: 20 de WO 2010/077634 y US 8,217,149), MIH1 (Affymetrix eBioscience; consultar EP 3 230 319), MDX-1105 (Roche/Genentech; ver WO2013019906 y US 8,217,149) STI-1014 (Sorrento; ver WO2013/181634), CK-301 (Checkpoint Therapeutics),
5 KN035 (3D Med/Alphamab; ver Zhang et al., 2017, Cell Discov. 3:17004), atezolizumab (TECENTRIQ; RG7446; MPDL3280A; R05541267; ver US 9,724,413), BMS-936559 (Bristol Myers Squibb; ver US 7,943,743, WO 2013/173223), avelumab (bavencio; consultar US 2014/0341917), LY3300054 (Eli Lilly Co.), CX-072 (Proclaim-CX-072; también llamado CytomX; ver WO2016/149201), FAZ053, KN035 (ver WO2017020801 y WO2017020802),
10 sugemalimab (CS1001), MDX-1105 (ver US 2015/0320859), anticuerpos anti-PD-L1 descritos en US 7,943,743, que incluyen 3G10, 12A4 (también denominados como BMS-936559), 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7, y 13G4, anticuerpos anti-PD-L1 como se describe en WO 2010/077634, US 8,217,149, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2011/066342, US 8,217,149, US 7,943,743, WO 2010/089411, US 7,635,757, US 8,217,149,
15 US 2009/0317368, WO 2011/066389, WO2017/034916, WO2017/020291, WO2017/020858, WO2017/020801, WO2016/111645, WO2016/197367, WO2016/061142, WO2016/149201, WO2016/000619, WO2016/160792, WO2016/022630, WO2016/007235, WO2015/ 179654, WO2015/173267, WO2015/181342, WO2015/109124, WO 2018/222711, WO2015/112805, WO2015/061668, WO2014/159562, WO2014/165082, WO2014/100079.

20 Los ejemplos de inhibidores de CTLA-4 incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales ipilimumab (Yervoy; Bristol Myers Squibb) y tremelimumab (Pfizer/MedImmune), trevilizumab, AGEN-1884 (Agenus) y ATOR-1015, los anticuerpos anti-CTLA4 descritos en WO 2001/014424, US 2005/0201994, EP 1212422, US 5,811,097, US 5,855,887, US 6,051,227, US 6,682,736, US 6,984,720, WO 01/14424, WO 00/37504, US 2002/0039581, US
25 2002/086014, WO 98/42752, US 6,207,156, US 5,977,318, US 7,109,003, y US 7,132,281, las proteínas dominantes negativas abatacept (Orencia; ver EP 2 855 533), que comprende la región Fe de la IgG 1 fusionada con el ECD de CTLA-4, y belatacept (Nulojix; ver WO 2014/207748), una variante de CTLA-4-Ig de mayor afinidad de segunda generación con dos sustituciones de aminoácidos en el ECD de CTLA-4 en relación con abatacept, polipéptidos
30 solubles de CTLA-4, por ejemplo, RG2077 y CTLA4-IgG4m (ver US 6,750,334), aptámeros anti-CTLA-4 y ARNs dirigidos a CTLA-4, por ejemplo, como se describe en US 2015/203848. Los ejemplos de inhibidores del ligando CTLA-4 se describen en Pile et al., 2015 (Encyclopedia of Inflammatory Diseases, M. Parnham (ed.), doi: 10.1007/978-3-0348-0620-6_20).

Los ejemplos de inhibidores del punto de control de la vía de señalización de TIGIT incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-TIGIT, tales como BMS-986207, COM902 (CGEN-15137; Compugen), AB154 (Arcus Biosciences) o etigilimab (OMP-313M32; OncoMed Pharmaceuticals), o los anticuerpos descritos en WO2017/059095, en particular "MAB10", US 2018/0185482, WO 2015/009856, y US 2019/0077864.

Los ejemplos de inhibidores del punto de control de B7-H3 incluyen, sin limitación, el anticuerpo monoclonal optimizado por Fc enoblituzumab (MGA271; Macrogenics; ver US 2012/0294796) y los anticuerpos anti-B7-H3 MGD009 (Macrogenics) y pidilizumab (ver US 7,332,582).

Los ejemplos de inhibidores de B7-H4 incluyen, sin limitación, anticuerpos como se describe en Dangaj et al., 2013 (Cancer Research 73:4820-9) y en Smith et al., 2014 (Gynecol Oncol, 134:181-189), WO 2013/025779 (por ejemplo, 2D1 codificado por las SEQ ID NO: 3 y 4, 2H9 codificado por la SEQ ID NO: 37 y 39, y 2E11 codificado por las SEQ ID NO: 41 y 43) y en WO 2013/067492 (por ejemplo, un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-8), oligonucleótidos antisentido morfolino, por ejemplo, como se describe en Kryczek et al., 2006 (J Exp Med, 203:871-81), o formas recombinantes solubles de B7-H4, tal como se describe en US 2012/0177645.

Los ejemplos de inhibidores de BTLA incluyen, sin limitación, los anticuerpos anti-BTLA descritos en Crawford y Wherry, 2009 (J Leukocyte Biol 86:5-8), WO 2011/014438 (por ejemplo, 4C7 o un anticuerpo que comprende cadenas pesadas y livianas de acuerdo con las SEQ ID NO: 8 y 15 y/o SEQ ID NO: 11 y 18), WO 2014/183885 (por ejemplo, el anticuerpo depositado bajo el número CNCM I-4752) y US 2018/155428.

Inhibidores del punto de control de la señalización de KIR incluyen, sin limitación, los anticuerpos monoclonales lirilumab (1-7F9; IPH2102; ver US 8,709,411), IPH4102 (Innate Pharma; ver Marie-Cardine et al., 2014, Cancer 74(21): 6060-70), anticuerpos anti-KIR descritos, por ejemplo, en US 2018/208652, US 2018/117147, US 2015/344576, WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende cadenas pesadas y livianas de acuerdo con las SEQ ID NO: 2 y 3), WO 2010/065939, WO 2012/071411, WO 2012/160448 y WO 2014/055648.

Los inhibidores de LAG-3 incluyen, sin limitación, los anticuerpos anti-LAG-3 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb; ver WO 2014/008218 y WO 2015/116539), 25F7 (ver US2011/0150892), IMP731 (ver WO 2008/132601), H5L7BW (consultar WO2014140180), MK-4280 (28G-10; Merck; ver WO 2016/028672), REGN3767 (Regneron/Sanofi), BAP050 (ver WO 2017/019894), IMP-701 (LAG-525; Novartis) Sym022 (Symphogen), TSR-033 (Tesaro), MGD013 (un anticuerpo DART biespecífico dirigido a LAG-3 y PD-1 desarrollado por MacroGenics), BI754111 (Boehringer Ingelheim), FS118 (un anticuerpo biespecífico dirigido a LAG-3 y PD-1 desarrollado por F-star), GSK2831781 (GSK) y anticuerpos descritos en WO 2009/044273, WO 2008/132601, WO 2015/042246, EP 2 320 940, US 2019/169294, US 2019/169292, WO 2016/028672, WO 2016/126858, WO 2016/200782, WO 2015/200119, WO 2017/220569, WO 2017/087589, WO 2017/219995, WO 2017/019846, WO 2017/106129, WO 2017/062888, WO 2018/071500, WO 2017/087901, US 2017/0260271, WO 2017/198741, WO2017/220555, WO2017/015560, WO2017/025498, WO2017/149143, WO 2018/069500, WO2018/083087, WO2018/034227 WO2014/140180, la proteína antagonista de LAG-3 AVA-017 (Avacta), la proteína de fusión soluble de LAG-3 IMP321 (eftilagimod alfa; Immutep; ver EP 2 205 257 y Brignone et al., 2007, J. Immunol., 179: 4202-4211), y las proteínas solubles de LAG-3 descritas en WO 2018/222711.

Los inhibidores de TIM-3 incluyen, sin limitación, anticuerpos dirigidos a TIM-3 tales como F38-2E2 (BioLegend), cobolimab (TSR-022; Tesaro), LY3321367 (Eli Lilly), MBG453 (Novartis) y anticuerpos descritos en, por ejemplo, WO 2013/006490, WO 2018/085469 (por ejemplo, anticuerpos que comprenden secuencias de cadena pesada y liviana codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con las SEQ ID NO: 3 y 4), WO 2018/106588, WO 2018/106529 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de cadena pesada y liviana de acuerdo con las SEQ ID NO: 8-11).

Los inhibidores de TIM-3 incluyen, sin limitación, inhibidores de CEACAM1 tales como el anticuerpo anti-CEACAM1 CM10 (cCAM Biotherapeutics; ver WO 2013/054331), anticuerpos descritos en WO 2015/075725 (por ejemplo, CM-24, 26H7, 5F4, TEC-11, 12-140-4, 4/3/17, COL-4, F36-54, 34B1, YG-C28F2, D14HD11, M8,7,7, D11-AD11, HEA81, B I. I, CLB-gran-10, F34-187, T84.1. B6,2, B 1,13, YG-C94G7, 12-140-5, scFv DIATHIS1, TET-2; cCAM Biotherapeutics), anticuerpos descritos en Watt et al., 2001 (Blood, 98: 1469-1479) y en WO 2010/12557 e inhibidores de PtdSer tales como bavituximab (Peregrine).

Los inhibidores de CD94/NKG2A incluyen, sin limitación, monalizumab (IPH2201; Innate Pharma) y los anticuerpos y el método para su producción descritos en US 9,422,368 (por ejemplo, Z199 humanizado; ver EP 2 628 753), EP 3 193 929 y WO2016/032334 (por ejemplo, Z270 humanizado; ver EP 2 628 753).

5 Los inhibidores de IDO incluyen, sin limitación, exiguamina A, epacadostat (INCB024360; InCyte; ver US 9,624,185), indoximod (Newlink Genetics; CAS#: 110117-83-4), NLG919 (Newlink Genetics/Genentech; CAS#: 1402836-58-1), GDC-0919 (Newlink Genetics/Genentech; CAS#: 1402836-58-1), F001287 (Flexus Biosciences/BMS; CAS#: 2221034-29-1), KHK2455 (Cheong et al., 2018, Expert Opin Ther Pat. 28(4):317-330), PF-
10 06840003 (ver WO 2016/181348), navoximod (RG6078, GDC-0919, NLG919; CAS#: 1402837-78-8), linrodostat (BMS-986205; Bristol-Myers Squibb; CAS#: 1923833-60-6), moléculas pequeñas tales como 1-metil-triptófano, derivados de pirrolidin-2,5-diona (ver WO 2015/173764) y los inhibidores de IDO descritos por Sheridan, 2015, Nat Biotechnol 33:321-322.

15 Los inhibidores de CD39 incluyen, sin limitación, A001485 (Arcus Biosciences), PSB 069 (CAS#: 78510-31-3) y el anticuerpo monoclonal anti-CD39 IPH5201 (Innate Pharma; ver Perrot et al., 2019, Cell Reports 8:2411-2425.E9).

Los inhibidores de CD73 incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CD73 tales como CPI-006 (Corvus Pharmaceuticals), MEDI9447 (MedImmune; ver WO2016075099), IPH5301
20 (Innate Pharma; ver Perrot et al., 2019, Cell Reports 8:2411-2425.E9), los anticuerpos anti-CD73 descritos en WO2018/110555, los inhibidores de molécula pequeña PBS 12379 (Tocris Bioscience; CAS#: 1802226-78-3), A000830, A001190 y A001421 (Arcus Biosciences; ver Becker et al., 2018, Cancer Research 78(13 Supplement):3691-3691, doi: 10.1158/1538-7445.AM2018-3691), CB-708 (Calithera Biosciences) y difosfonatos basados en análogos de
25 nucleósidos citotóxicos de purina descritos por Allard et al., 2018 (Immunol Rev., 276(1):121-144).

Los inhibidores de A2AR incluyen, sin limitación, inhibidores de molécula pequeña tales como istradefilina (KW-6002; CAS#: 155270-99-8), PBF-509 (Palobiopharma), ciforadenant (CPI-444: Corvus Pharma/Genentech; CAS#: 1202402-40-1), ST1535 ([2butil-
30 9-metil-8-(2H-1,2,3-triazol-2-il)-9H-purin-6-il]amino]; CAS#: 496955-42-1), ST4206 (ver

Stasi et al., 2015, *Europ J Pharm* 761:353–361; CAS#: 1246018–36–9), tozadenant (SYN115; CAS#: 870070–55–6), V81444 (ver WO 2002/055082), preladenant (SCH420814; Merck; CAS#: 377727–87–2), vipadenant (BIIB014; CAS#: 442908–10–3), ST1535 (CAS#: 496955–42–1), SCH412348 (CAS#: 377727–26–9), SCH442416 (Axon 2283; Axon Medchem; CAS#: 316173–57–6), ZM241385 (4–(2–(7–amino–2–(2–furyl)–(1,2,4)triazolo(2,3–a)–(1,3,5)triazin–5–il–amino)etil)fenol; Cas#: 139180–30–6), AZD4635 (AstraZeneca), AB928 (un inhibidor de molécula pequeña dual A2AR/A2BR; Arcus Biosciences) y SCH58261 (ver Popoli et al., 2000, *Neuropsychopharm* 22:522–529; CAS#: 160098–96–4).

Los inhibidores de A2BR incluyen, sin limitación, AB928 (n inhibidor de molécula pequeña dual A2AR/A2BR; Arcus Biosciences), MRS 1706 (CAS#: 264622–53–9), GS6201 (CAS#: 752222–83–6) y PBS 1115 (CAS#: 152529–79–8).

Los inhibidores de VISTA incluyen, sin limitación, anticuerpos anti–VISTA tales como JNJ–61610588 (onvatilimab; Janssen Biotech) y el inhibidor de molécula pequeña CA–170 (molécula pequeña anti–PD–L1/L2 y anti–VISTA; CAS#: 1673534–76–3).

Los inhibidores de Siglec incluyen, sin limitación, los anticuerpos anti–Siglec–7 descritos en US 2019/023786 y WO 2018/027203 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 15), el anticuerpo anti–Siglec–2 inotuzumab ozogamicina (Besponsa; ver US 8,153,768 y US 9,642,918), el anticuerpo anti–Siglec–3 gemtuzumab ozogamicina (Milotarg; ver US 9,359,442) o los anticuerpos anti–Siglec–9 descritos en US 2019/062427, US 2019/023786, WO 2019/011855, WO 2019/011852 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende las CDR de acuerdo con las SEQ ID NO: 171–176, o 3 y 4, o 5 y 6, o 7 y 8, o 9 y 10, o 11 y 12, o 13 y 14, o 15 y 16, o 17 y 18, o 19 y 20, o 21 y 22, o 23 y 24, o 25 y 26), US 2017/306014 y EP 3 146 979.

Los inhibidores de CD20 incluyen, sin limitación, anticuerpos anti–CD20 tales como rituximab (RITUXAN; IDEC–102; IDEC–C2B8; ver US 5,843,439), ABP 798 (rituximab biosimilar), ofatumumab (2F2; ver WO2004/035607), obinutuzumab, ocrelizumab (2h7; ver WO 2004/056312), ibritumomab tiuxetan (Zevalin), tositumomab, ublituximab (LFB–R603; LFB Biotechnologies) y los anticuerpos descritos en US 2018/0036306 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende cadenas livianas y pesadas de acuerdo con las SEQ ID NO: 1–3

y 4–6, o 7 y 8, o 9 y 10).

Los inhibidores de GARP incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-GARP tales como ARGX-115 (arGEN-X) y los anticuerpos y métodos para su producción divulgados en US 2019/127483, US 2019/016811, US 2018/327511, US 2016/251438, EP 3 253 796.

5 Los inhibidores de CD47 incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CD47 tales como HuF9-G4 (Stanford University/Forty Seven), CC-90002/INBRX-103 (Celgene/Inhibrx), SRF231 (Surface Oncology), IBI188 (Innovent Biologics), AO-176 (Arch Oncology), anticuerpos biespecíficos dirigidos a CD47 que incluyen TG-1801 (NI-1701; anticuerpo monoclonal biespecífico dirigido a CD47 y CD19; Novimmune/TG Therapeutics) y NI-1801
10 (anticuerpo monoclonal biespecífico dirigido a CD47 y mesotelina; Novimmune), y proteínas de fusión de CD47 tales como ALX148 (ALX Oncology; ver Kauder et al., 2019, PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0201832).

Los inhibidores de SIRP α incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-SIRP α tales como OSE-172 (Boehringer Ingelheim/OSE), FSI-189 (Forty Seven), proteínas de fusión anti-
15 SIRP α tales como TTI-621 y TTI-662 (Trillium Therapeutics; ver WO 2014/094122).

Los inhibidores de PVRIG incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-PVRIG tales como COM701 (CGEN-15029) y los anticuerpos y métodos para su fabricación descritos en, por ejemplo, WO 2018/033798 (por ejemplo, CHA,7,518,1H4(S241P), CHA,7,538.1.2.H4(S241P), CPA,9,086H4(S241P), CPA,9,083H4(S241P), CHA,9,547,7.H4(S241P),
20 CHA,9,547,13.H4(S241P) y anticuerpos que comprenden un dominio pesado variable de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 y un dominio liviano variable de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 de WO 2018/033798 o anticuerpos que comprenden una cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO:9 y una cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 14; WO 2018/033798 además describe anticuerpos anti-TIGIT y terapias de combinación con anticuerpos anti-
25 TIGIT y anti-PVRIG), WO2016134333, WO2018017864 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una cadena pesada de acuerdo con las SEQ ID NO: 5–7 que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 11 y/o una cadena ligera de acuerdo con las SEQ ID NO: 8–10 que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12, o un anticuerpo codificado por las SEQ ID NO: 13 y/o 14 o SEQ ID NO: 24 y/o 29, u otro
30 anticuerpo descrito en WO 2018/017864) y anticuerpos anti-PVRIG y péptidos de fusión

descritos en WO 2016/134335.

Los inhibidores de CSF1R incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CSF1R cabiralizumab (FPA008; FivePrime; ver WO 2011/140249, WO 2013/169264 y WO 2014/036357), IMC-CS4 (EiiLilly), emactuzumab (R05509554; Roche), RG7155 (WO 2011/70024, WO 2011/107553, WO 2011/131407, WO 2013/87699, WO 2013/119716, WO 2013/132044) y los inhibidores de molécula pequeña BLZ945 (CAS#: 953769-46-5) y pexidartinib (PLX3397; Selleckchem; CAS#: 1029044-16-3).

Los inhibidores de CSF1 incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CSF1 descritos en EP 1 223 980 y Weir et al., 1996 (J Bone Mineral Res 11: 1474-1481), WO 2014/132072, y ADN y ARn antisentido como se describe en WO 2001/030381.

Los ejemplos de inhibidores de NOX incluyen, sin limitación, inhibidores de NOX1 tales como la molécula pequeña ML171 (Gianni et al., 2010, ACS Chem Biol 5(10):981-93, NOS31 (Yamamoto et al., 2018, Biol Pharm Bull. 41(3):419-426), inhibidores de NOX2 tales como las moléculas pequeñas ceplene (diclorhidrato de histamina; CAS#: 56-92-8), BJ-1301 (Gautam et al., 2017, Mol Cancer Ther 16(10):2144-2156; CAS#: 1287234-48-3) e inhibidores descritos en Lu et al., 2017, Biochem Pharmacol 143:25-38, inhibidores de NOX4 tales como los inhibidores de molécula pequeña VAS2870 (Altenhöfer et al., 2012, Cell Mol Life Sciences 69(14):2327-2343), difenileno yodonio (CAS#: 244-54-2) y GKT137831 (CAS#: 1218942-37-0; ver Tang et al., 2018, 19(10):578-585).

Los inhibidores de TDO incluyen, sin limitación, derivados de 4-(indol-3-il)-pirazol (ver US 9,126,984 y US 2016/0263087), derivados sustituidos de 3-indol (ver WO 2015/140717, WO 2017/025868, WO 2016/147144), derivados de 3-(indol-3-il)-piridina (ver US 2015/0225367 y WO 2015/121812), antagonistas duales de IDO/TDO, tales como inhibidores de molécula pequeña dual IDO/TDO descritos en WO 2015/150097, WO 2015/082499, WO 2016/026772, WO 2016/071283, WO 2016/071293, WO 2017/007700, y el inhibidor de molécula pequeña CB548 (Kim, C, et al., 2018, Annals Oncol 29 (suppl_8): viii400-viii441).

De acuerdo con la descripción, el inhibidor de punto de control inmunitario es un inhibidor de una proteína de punto de control inhibidora, pero con preferencia no es un

inhibidor de una proteína de punto de control estimuladora. Como se describe en la presente, se conocen varios inhibidores de CTLA-4, PD-1, TIGIT, B7-H3, B7-H4, BTLA, KIR, LAG-3, TIM-3, CD94/NKG2A, IDO, A2AR, A2BR, VISTA, Siglec, CD20, CD39, CD73, GARP, CD47, PVRIG, CSF1R, NOX y TDO e inhibidores de los ligandos respectivos, y varios de ellos ya
5 están en ensayos clínicos o incluso aprobados. Sobre la base de estos inhibidores de puntos de control inmunitario conocidos, se pueden desarrollar inhibidores de puntos de control inmunitario alternativos. En particular, los inhibidores conocidos de las proteínas de punto de control inmunitario preferidas se pueden usar como tales o se pueden usar análogos de los mismos, en particular formas quimerizadas, humanizadas o humanas de anticuerpos y
10 anticuerpos de competición cruzada con cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente.

Un experto en la técnica entenderá que los antagonistas o los anticuerpos también pueden dirigirse a otras dianas de puntos de control inmunitario, siempre que el direccionamiento provoque la estimulación de una respuesta inmunitaria, tal como una
15 respuesta inmunitaria antitumoral reflejada en un aumento de la proliferación de células T, mejora de la activación de células T y/o un aumento de la producción de citoquinas (por ejemplo, IFN- γ , IL2).

Los inhibidores de puntos de control se pueden administrar de cualquier modo y por cualquier vía conocidos en la técnica. El modo y la vía de administración dependerán del tipo
20 de inhibidor de puntos de control que se va a utilizar.

Los inhibidores de puntos de control se pueden administrar en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada, tal como se describe en la presente.

Los inhibidores de puntos de control se pueden administrar en forma de ácido nucleico, como moléculas de ADN o ARN, que codifican un inhibidor de puntos de control inmunitario,
25 por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibidora o un anticuerpo o fragmento del mismo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden administrar codificados en vectores de expresión, como se describe en la presente. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar como tales, por ejemplo, en forma de plásmido o molécula de ARNm, o complejadas con un vehículo de administración, por ejemplo, un liposoma, lipoplex o partículas lipídicas de ácido
30 nucleico. Los inhibidores de puntos de control también se pueden administrar a través de un

virus oncolítico que comprende un casete de expresión que codifica el inhibidor de puntos de control. Los inhibidores de puntos de control también se pueden administrar mediante la administración de células endogénicas o alogénicas capaces de expresar un inhibidor de puntos de control, por ejemplo, en forma de terapia basada en células.

5 El término “terapia basada en células” se refiere al trasplante de células (por ejemplo, linfocitos T, células dendríticas o células madre) que expresan un inhibidor del punto de control inmunitario en un sujeto con el fin de tratar una enfermedad o trastorno (por ejemplo, una enfermedad cancerosa). En una modalidad, la terapia basada en células comprende células manipuladas genéticamente. En una modalidad, las células manipuladas genéticamente
10 expresan un inhibidor del punto de control inmunitario, tal como se describe en la presente. En una modalidad, las células manipuladas genéticamente expresan un inhibidor del punto de control inmunitario que es una molécula de ácido nucleico inhibidora, tal como un ARNsi, ARNsh, un oligonucleótido, ADN o ARN antisentido, un aptámero, un anticuerpo o un fragmento del mismo o una proteína soluble del punto de control inmunitario o fusión. Las
15 células manipuladas genéticamente también pueden expresar otros agentes que mejoran la función de las células T. Tales agentes son conocidos en la técnica. Las terapias basadas en células para el uso en la inhibición de la señalización del punto de control inmunitario se divulgan, por ejemplo, en el documento WO 2018/222711, incorporado aquí por referencia en su totalidad.

20 El término “virus oncolítico”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un virus capaz de replicarse selectivamente en y lentificar el crecimiento o inducir la muerte de una célula cancerosa o hiperproliferativa, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mientras que no tiene ningún efecto o tiene un efecto mínimo en las células normales. Un virus oncolítico para la administración de un inhibidor del punto de control inmunitario comprende un casete de
25 expresión que puede codificar un inhibidor del punto de control inmunitario que es una molécula de ácido nucleico inhibidora, tal como un ARNsi, ARNsh, un oligonucleótido, ADN o ARN antisentido, un aptámero, un anticuerpo o un fragmento del mismo o una proteína soluble del punto de control inmunitario o fusión. Con preferencia, el virus oncolítico es competente en replicación y el casete de expresión está bajo el control de un promotor viral, por ejemplo,
30 un promotor sintético de poxvirus temprano/tardío. Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen el virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabdovirus (por ejemplo, picornavirus tal como virus Seneca Valley; SVV-001), coxsackievirus, parvovirus, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del herpes simple (HSV; OncoVEX GMCSF), retrovirus (por ejemplo, virus de la

gripe), virus del sarampión, reovirus, virus Sinbis, virus vaccinia, como se describe a modo de ejemplo en WO 2017/209053 (incluidas las cepas Copenhagen, Western Reserve, Wyeth), y adenovirus (por ejemplo, Delta-24, Delta-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, Onyx-015, ColoAd1, H101, AD5/3-D24-GMCSF). La generación de virus oncolíticos recombinantes que comprenden una forma soluble de un inhibidor del punto de control inmunitario y los métodos para su uso se divulgan en el documento WO 2018/022831, que se incorporan por referencia en su totalidad. Los virus oncolíticos se pueden utilizar como virus atenuados.

En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y una combinación de los mismos.

En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo anti-PD-1.

En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 comprende cemiplimab (LIBTAYO, REGN2810), nivolumab (OPDIVO; BMS-936558), pembrolizumab (KEYTRUDA; MK-3475), pidilizumab (CT-011), spartalizumab (PDR001), MEDI0680 (AMP-514), dostarlimab (TSR-042), cetrelimab (JNJ 63723283), toripalimab (JS001), AMP-224 (GSK-2661380), PF-06801591, tislelizumab (BGB-A317), ABBV-181, BI 754091, sintilimab (IBI308), o camrelizumab (SHR-1210).

En ciertas modalidades, el inhibidor del punto de control inmunitario comprende un anticuerpo anti-PD-L1.

En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 comprende atezolizumab (TECENTRIQ; RG7446; MPDL3280A; R05541267), durvalumab (MEDI4736), BMS-936559, avelumab (bavencio), lodapolimab (LY3300054), CX-072 (Proclaim-CX-072), FAZ053, KN035, sugemalimab (CS1001), o MDX-1105.

Como se describe en la presente, un agente de unión biespecífico se administra junto, es decir, se coadministra, con un agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 a un sujeto, por ejemplo, un paciente. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente de unión biespecífico se administran como

una composición única al sujeto. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente de unión biespecífico se administran en forma concurrente (como composiciones separadas al mismo tiempo) al sujeto. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente de unión biespecífico se administran por separado al sujeto. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 se administra antes del agente de unión biespecífico al sujeto. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 se administra después del agente de unión biespecífico al sujeto. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente de unión biespecífico se administran al sujeto el mismo día. En ciertas modalidades, el agente que estabiliza o aumenta la expresión de CLDN18.2 y el agente de unión biespecífico se administran al sujeto en diferentes días.

El término “preparación medicinal” se refiere a cualquier producto destinado a un uso médico. El término incluye composiciones farmacéuticas que contienen uno o más ingredientes activos, así como disposiciones, por ejemplo kits, de uno o más ingredientes activos, que se pueden presentar juntos o por separado, por ejemplo, en viales separados, opcionalmente junto con material informativo relativo, por ejemplo, a su administración, efecto, etc.

Los compuestos y agentes descritos en la presente se pueden administrarse en forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son con preferencia estériles y contienen una cantidad eficaz de los compuestos y agentes descritos en la presente y, opcionalmente, de otros agentes de acuerdo con se describe en la presente para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas normalmente se suministran en una forma de dosificación uniforme y se pueden preparar de una manera conocida per se. Una composición farmacéutica se puede presentar, por ejemplo, en forma de solución o suspensión.

Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias amortiguadoras, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes, todos los cuales son con preferencia

farmacéuticamente aceptables. El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

5 Las sales que no son farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar para preparar sales farmacéuticamente aceptables y se incluyen en la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de este tipo comprenden de forma no limitativa las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden preparar como sales de metales alcalinos
10 o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Las sustancias amortiguadoras adecuadas para su uso en una composición farmacéutica se incluyen ácido acético en sal, ácido cítrico en sal, ácido bórico en sal y ácido fosfórico en sal.

15 Los conservantes adecuados para su uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como lactato de Ringer.

20 El término “portador” se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de origen natural o sintético, en el que se combina el componente activo para facilitar, mejorar o permitir la aplicación. De acuerdo con la invención, el término “portador” también incluye uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes, que son adecuados para la administración a un paciente.

25 Las posibles sustancias portadoras para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución estéril de cloruro de sodio, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de láctido biocompatibles, copolímeros de láctido/glicólido o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

El término “excipiente”, cuando se utiliza en la presente, pretende indicar todas las sustancias que pueden estar presentes en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes tensioactivos, conservantes, emulsionantes, amortiguadores, agentes saborizantes o colorantes.

Los agentes y composiciones descritos en la presente se pueden administrar por cualquier vía convencional, tal como por administración parenteral, incluyendo inyección o infusión. La administración es con preferencia parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral normalmente comprenden una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es con preferencia isotónica para la sangre del receptor. Los ejemplos de portadores y solventes compatibles son la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, normalmente se utilizan aceites fijos estériles como medio de solución o suspensión.

Los agentes y composiciones descritos en la presente se administran en cantidades efectivas. Una “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad que consigue una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o una afección particular, la reacción deseada se refiere con preferencia a la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende lentificar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o invertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en el tratamiento de una enfermedad o afección también puede consistir en retrasar o prevenir la aparición de dicha enfermedad o afección.

La cantidad efectiva de un agente o composición descrita en la presente dependerá de la afección para tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluidos la edad, el estado fisiológico, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia de acompañamiento (si existe), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente pueden depender de varios de dichos parámetros. En caso de que la

reacción de un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, se pueden utilizar dosis más altas (o dosis efectivamente más altas conseguidas por una vía de administración diferente y más localizada).

5 Los agentes y composiciones descritos en la presente se pueden administrar a pacientes, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir diversos trastornos como los descritos en la presente. Los pacientes preferidos incluyen pacientes humanos con trastornos que se pueden corregir o mejorar mediante la administración de los agentes y composiciones descritos en la presente. Esto incluye trastornos que implican células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de CLDN18.2.

10 Por ejemplo, En algunas modalidades, los agentes descritos en la presente se pueden usar para tratar a un paciente con una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa como la descrita en la presente caracterizada por la presencia de células cancerosas que expresan CLDN18.2.

15 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la invención también se pueden usar para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar junto con sustancias potenciadoras de la inmunidad complementarias, tal como uno o más adyuvantes, y pueden comprender una o más sustancias potenciadoras de la inmunidad para
20 aumentar aún más su eficacia, con preferencia para lograr un efecto aditivo de inmunoestimulación. El término “adyuvante” se refiere a compuestos que prolongan o potencian o aceleran una respuesta inmunitaria. A este respecto, son posibles varios mecanismos, en función de los distintos tipos de adyuvantes. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración de DC, por ejemplo, los lipopolisacáridos o el ligando CD40,
25 constituyen una primera clase de adyuvantes adecuados. En general, cualquier agente que influya en el sistema inmunitario del tipo de una “señal de peligro” (LPS, GP96, ARNs etc.) o citoquinas, tales como GM-CSF, se puede utilizar como adyuvante que permite intensificar y/o influir de forma controlada en una respuesta inmunitaria. Los oligodesoxinucleótidos CpG también se pueden utilizar opcionalmente en este contexto, aunque se deben tener en cuenta
30 sus efectos secundarios que se producen en determinadas circunstancias, como se ha

explicado anteriormente. Los adyuvantes particularmente preferidos son citoquinas, como monoquinas, linfoquinas, interleuquinas o quimioquinas, por ejemplo IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, INF α , INF- γ , GM-CSF, LT- α , o factores de crecimiento, por ejemplo hGH. Otros adyuvantes conocidos son hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund o aceites tal como Montanide®, el más preferido Montanide® ISA51. Los lipopéptidos, tal como Pam3Cys, también son adecuados para usar como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente invención.

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

El tratamiento del cáncer representa un campo en el que las estrategias de combinación son especialmente deseables, ya que con frecuencia la acción combinada de dos, tres, cuatro o incluso más fármacos/terapias contra el cáncer genera efectos sinérgicos que son considerablemente más fuertes que el impacto de un enfoque monoterapéutico. Así, en otra modalidad de la presente invención, un tratamiento contra el cáncer que utiliza mecanismos basados en la inmunidad o la vacunación, tal como los métodos y composiciones de la presente invención, se puede combinar eficazmente con otros fármacos y/o métodos dirigidos a mecanismos específicos similares o de otro tipo. Entre ellos se encuentran, por ejemplo, combinaciones con terapias tumorales convencionales, estrategias multiepítipo, inmunoterapia adicional y enfoques de tratamiento dirigidos a la angiogénesis o la apoptosis (para una revisión, ver, por ejemplo, Andersen et al. 2008: Cancer treatment: the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy, 57(11): 1735–1743.) La administración secuencial de diferentes agentes puede inhibir el crecimiento de las células cancerosas en diferentes puntos de control, mientras que otros agentes pueden, por ejemplo, inhibir la neoangiogénesis, la supervivencia de las células malignas o las metástasis, convirtiendo potencialmente el cáncer en una enfermedad crónica. La siguiente lista proporciona algunos ejemplos no limitantes de fármacos y terapias contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con la presente invención:

1. Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento estándar para múltiples tipos de cáncer. Los agentes

quimioterapéuticos más comunes actúan mediante la destrucción de células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de las células cancerosas. Por lo tanto, una combinación con fármacos quimioterapéuticos convencionales tales como, por ejemplo, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de la topoisomerasa y otros agentes antitumorales que afectan la división celular o la síntesis de ADN puede mejorar significativamente los efectos terapéuticos de la presente invención mediante la eliminación de células supresoras, el reinicio del sistema inmunitario, haciendo que las células tumorales sean más susceptibles a la destrucción mediada por el sistema inmunitario o mediante la activación adicional de células del sistema inmunitario. En múltiples estudios se ha demostrado una acción anticáncer aditiva de fármacos quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos basados en la vacunación (ver, por ejemplo, Quoix et al. 2011: Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* 12(12): 1125–33.; ver también Liseth et al. 2010: Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies: the hematological experience. *J Biomed Biotechnol.* 2010: 6920979; ver también Hirooka et al 2009: A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38(3): e69–74). Hay cientos de fármacos quimioterapéuticos disponibles que son básicamente adecuados para terapias combinadas. Algunos ejemplos (no limitantes) de fármacos quimioterapéuticos que se pueden combinar con la presente invención son carboplatino (Paraplatin), cisplatino (Platinol, Platinol-AQ), ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar), docetaxel (Taxotere), doxorubicina (Adriamycin), erlotinib (Tarceva), etopósido (VePesid), gemcitabina (Gemzar), imatinib mesilato (Gleevec), irinotecano (Camptosar), metotrexato (Folex, Mexate, Amethopterin), paclitaxel (Taxol, Abraxane), sorafinib (Nexavar), sunitinib (Sutent), topotecano (Hycamtin), vincristina (Oncovin, Vincasar PFS), y vinblastina (Velban).

2. Cirugía

La cirugía del cáncer –una operación para extirpar el tumor– sigue siendo la base del tratamiento del cáncer. La cirugía se puede combinar con otros tratamientos contra el cáncer para eliminar cualquier célula tumoral restante. La combinación de métodos quirúrgicos con un tratamiento inmunoterapéutico posterior es un enfoque prometedor que se ha demostrado en innumerables ocasiones.

3. Radiación

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

Modalidades de combinaciones de agentes de unión biespecíficos y otros agentes terapéuticos

En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con un compuesto de platino, y un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo.

En algunas modalidades, el compuesto de platino es oxaliplatino. En algunas

modalidades, el compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo se selecciona del grupo que consiste en fluorouracilo (5-FU), capecitabina, floxuridina, tegafur, doxifluridina, y carmofur. En algunas modalidades, el compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo es fluorouracilo (5-FU) o capecitabina.

5 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino y 5-fluorouracilo o un precursor del mismo. En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con
10 oxaliplatino y 5-fluorouracilo u oxaliplatino y capecitabina. En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino y 5-fluorouracilo.

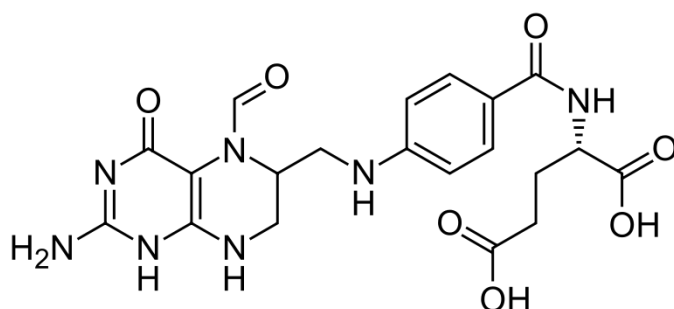
 En algunas modalidades, la combinación de un agente de unión biespecífico, un
15 compuesto de platino, y un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo comprende adicionalmente ácido folínico.

 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino, 5-fluorouracilo, y ácido folínico.

20 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con un régimen de quimioterapia mFOLFOX6.

q

 El término “ácido folínico” o “leucovorina” se refiere a un compuesto útil en combinación
25 sinérgica con el agente de quimioterapia 5-fluorouracilo. Ácido folínico tiene la siguiente fórmula:



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

5 FOLFOX es un régimen de quimioterapia compuesto de ácido folínico (leucovorina), 5-fluorouracilo y oxaliplatino.

Existen varios regímenes FOLFOX diferentes que difieren en las dosis y las formas de administración de los tres fármacos.

En algunas modalidades, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con un régimen FOLFOX-6 modificado (mFOLFOX6). En algunas modalidades, el régimen mFOLFOX6 comprende 85 mg/m² de oxaliplatino como infusión IV, 400 mg/m² de leucovorina como infusión IV y 400 mg/m² el bolo IV de 5-FU, seguido por 2.400 mg/m² de 5-FU como infusión IV continua.

mFOLFOX6 se puede repetir cada 2 semanas.

15 En algunas modalidades, la combinación de un agente de unión biespecífico, un compuesto de platino, un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo y ácido folínico comprende adicionalmente un inhibidor de puntos de control inmunitario, por ejemplo, seleccionado de un inhibidor de PD-1 y un inhibidor de PD-L1, en particular un anticuerpo anti-PD-1 tal como nivolumab o pembrolizumab, en particular pembrolizumab.

20 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido folínico y nivolumab.

En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido folínico y pembrolizumab.

5 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con régimen de quimioterapia mFOLFOX6 y nivolumab.

En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con régimen de quimioterapia mFOLFOX6 y pembrolizumab.

10 En algunas modalidades, nivolumab comprende una secuencia de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos:

15 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYY
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTLVT VSSASTKGPS
VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS
VVTVPSSSLG TKTYTCNVDH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT
VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
20 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 35), y

(b) la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SILAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA
RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP
SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT
25 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK (SEQ ID NO: 36).

El nivolumab se puede administrar por vía intravenosa de acuerdo con los lineamientos institucionales, los lineamientos publicados y la información de prescripción del producto respectivo, y dosificado de acuerdo con este protocolo. En algunas modalidades, nivolumab

se administra a una dosis de 240 mg por vía intravenosa. En algunas modalidades, nivolumab se administra a una dosis de 240 mg cada 2 semanas por vía intravenosa. En algunas modalidades, nivolumab se administra a una dosis de 480 mg por vía intravenosa. En algunas modalidades, nivolumab se administra a una dosis de 480 mg cada 4 semanas por vía intravenosa.

En algunas modalidades, pembrolizumab comprende una secuencia de cadena pesada y cadena ligera, en donde:

(a) la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos:

10 QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF
 NEKFKNRVTL TTDSTTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
 15 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 37), y

(b) la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos:

20 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSILHWY QQKPGQAPRL LIILASILES
 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLP LTFGGGTKVEI KRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL
 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 38).

Pembrolizumab se puede administrar por vía intravenosa de acuerdo con los lineamientos institucionales, los lineamientos publicados y la información de prescripción del producto respectivo, y dosificado de acuerdo con este protocolo. En algunas modalidades, pembrolizumab se administra a una dosis de 200 mg por vía intravenosa. En algunas modalidades, pembrolizumab se administra a una dosis de 200 mg cada 3 semanas por vía intravenosa. En algunas modalidades, pembrolizumab se administra a una dosis de 400 mg por vía intravenosa. En algunas modalidades, pembrolizumab se administra a una dosis de 400 mg cada 6 semanas por vía intravenosa.

En algunas modalidades, la combinación de un agente de unión biespecífico, un compuesto de platino, un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo y ácido folínico comprende adicionalmente un análogo de camptotecina, por ejemplo, irinotecano.

5 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido folínico e irinotecano.

En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con régimen de quimioterapia mFOLFIRINOX.

10 FOLFIRINOX es un régimen de quimioterapia compuesto de ácido folínico (leucovorina), 5-fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecano.

En algunas modalidades, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con un régimen de quimioterapia FOLFIRINOX modificado (mFOLFIRINOX). En algunas modalidades, el régimen mFOLFIRINOX comprende 85 mg/m²
15 de oxaliplatino como infusión IV, 180 mg/m² de irinotecano como infusión IV, 400 mg/m² de leucovorina como infusión IV y 400 mg/m² en bolo IV de 5-FU, seguido de 2.400 mg/m² de 5-FU como infusión IV continua.

mFOLFIRINOX se puede repetir cada 2 semanas.

20 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en combinación con un taxano y un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano.

En algunas modalidades, el taxano es paclitaxel. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une a VEGFR2 humano es ramucirumab.

25 En algunas modalidades de las composiciones, preparaciones medicinales o métodos descritos en la presente, un agente de unión biespecífico descrito en la presente se usa en

combinación con paclitaxel y ramucirumab.

En algunas modalidades, el cáncer que se debe tratar con las combinaciones descritas anteriormente es CLDN18.2 positivo.

En algunas modalidades, el cáncer que se debe tratar con las combinaciones descritas anteriormente, en particular la combinación de un agente de unión biespecífico, un compuesto de platino, un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo, ácido folínico y un inhibidor de puntos de control inmunitario, tal como la combinación de un agente de unión biespecífico, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido folínico y pembrolizumab, por ejemplo, la combinación de un agente de unión biespecífico, régimen de quimioterapia mFOLFOX6 y pembrolizumab es cáncer de estómago y/o cáncer de la unión gastroesofágica, en particular adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica (GEJ) metastásico o localmente avanzado no resecable.

En algunas modalidades, el cáncer que se debe tratar con las combinaciones descritas anteriormente, en particular la combinación de un agente de unión biespecífico, un taxano y un anticuerpo que se une a VEGFR2 humano, tales como la combinación de un agente de unión biespecífico, paclitaxel y ramucirumab es cáncer de estómago y/o cáncer de la unión gastroesofágica, en particular adenocarcinoma gástrico o de la unión gastroesofágica (GEJ) metastásico o localmente avanzado no resecable.

En algunas modalidades, el cáncer que se debe tratar con las combinaciones descritas anteriormente, en particular la combinación de un agente de unión biespecífico, un compuesto de platino, un compuesto de fluoropirimidina o precursor del mismo, ácido folínico y un análogo de camptotecina, tal como la combinación de un agente de unión biespecífico, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido folínico e irinotecano, por ejemplo, la combinación de un agente de unión biespecífico y régimen de quimioterapia mFOLFIRINOX es cáncer pancreático, en particular adenocarcinoma pancreático metastásico o localmente avanzado no resecable.

Como se usa en la presente, “localmente avanzado” significa que el cáncer se ha extendido a los tejidos cercanos. Como se usa en la presente, “no resecable” significa que el cáncer no se puede extirpar mediante cirugía. Como se usa en la presente, “metastásico” significa que el cáncer se ha extendido a otras partes del cuerpo.

En alguna modalidad de las combinaciones descritas anteriormente, el agente de unión biespecífico comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde

(i) la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27;

5 (ii) la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28;

(iii) la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29; y

10 (iv) la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29.

El agente de unión biespecífico descrito en la presente se puede administrar a través de una vena del brazo (infusión intravenosa) o justo debajo de la piel (inyección subcutánea). El tratamiento puede realizarse en ciclos de 7 o 14 días (1 o 2 semanas). En cada ciclo de tratamiento, las infusiones intravenosas o las inyecciones subcutáneas se administrarán una
15 vez a la semana o una vez cada 2 semanas. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico descrito en la presente se administra cada 7 días en cada ciclo de 14 días. En algunas modalidades, el agente de unión biespecífico descrito en la presente se administra a una dosis de entre 4 µg y 3600 µg tales como a una dosis de 4 µg, 12 µg, 36 µg, 100 µg, 280 µg, 700 µg, 1500 µg, 2400 µg o 3600 µg.

20 La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Citotoxicidad de ASP2138 en combinación con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel contra células de carcinoma pancreático que expresa Claudina18.2
25

OBJETIVOS

Este estudio se llevó a cabo para examinar la citotoxicidad de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudin18.2 y CD3 humanos que comprende cuatro cadenas polipeptídicas de acuerdo con las SEQ ID NO: 27, 28, 29 y 29, contra células tumorales con o sin tratamiento con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel en ensayos de citotoxicidad de células T redirigida (RTCC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Artículos de prueba

ASP2138 (lote nº PDB00743–BDS; Astellas Pharma Inc., Tokio, Japón) se diluyó en medio RPMI–1640 suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS, medio de ensayo). El clorhidrato de gemcitabina (Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN, EE.UU.) se disolvió en solución salina amortiguadora con fosfato para obtener una solución de 40 mg/ml y también se diluyó en medio RPMI–1640 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (medio de cultivo). El paclitaxel (Sawai Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japón) se diluyó en el medio de cultivo.

Línea celular

MIA PaCa–2_GFP_CLDN18.2_27 (MIA PaCa–2) se estableció en Astellas Pharma Inc. a partir de MIA PaCa–2 original, línea celular de carcinoma pancreático adquirida en RIKEN BioResource Research Center (Ibaraki, Japón), mediante transducción de claudina18.2 humana y proteína verde fluorescente (GFP). MIA PaCa–2 se cultivó en medio de cultivo suplementado con 10 µg/ml de blasticidina y 1 µg/ml de puomicina a 37 °C en CO₂ 5 %.

Tratamiento con agentes quimioterapéuticos

Las células MIA PaCa–2 se sembraron en placas de cultivo tisular de 10 cm (AGC TECHNO GLASS CO., LTD., Shizuoka, Japón) a $2,0 \times 10^6$ células/10 ml en medio de cultivo y se cultivaron a 37 °C con CO₂ 5 % durante 1 día. Después de la incubación, se añadieron

clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (agentes quimioterapéuticos) a la placa y se cultivaron durante 2 días más. El clorhidrato de gemcitabina se añadió hasta alcanzar una concentración final de 0,1 µg/ml en forma libre. Se añadió paclitaxel para alcanzar una concentración final de 0,003 µg/ml.

5 **Expresión de CLDN18.2**

Las células MIA PaCa-2 tratadas con o sin agentes quimioterapéuticos se tiñeron con 1 µg de zolbetuximab, anticuerpo anti-claudina18.2 (Lote N° 7D900, Astellas Pharma, Inc.). Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo APC anti-Fc IgG humano (BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA). Se utilizó Zombie Aqua Fixable Viability Kit (BioLegend, Inc.) para 10 determinar las células muertas. La expresión de Claudina18.2 se midió con un citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer 10 (Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Alemania) y se analizó con el software FlowJo 10,5,3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.).

Ensayos de RTCC

Las células MIA PaCa-2 tratadas con o sin agentes quimioterapéuticos, las células 15 mononucleares de sangre periférica humana (PBMC; Lonza Group AG, Basilea, Suiza) y ASP2138 en medio de ensayo se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pozos (AGC TECHNO GLASS CO., LTD.) y se cultivaron a 37 °C en CO₂ 5 % durante 1 día. Las células MIA PaCa-2 se sembraron a $2,0 \times 10^4$ células/100 µL/pozo. Se añadieron PBMC a $2,0 \times 10^5$ células/50 µL/pozo (relación de células efectoras a células diana de 10:1). Se añadió ASP2138 20 a 50 µL/pozo para alcanzar concentraciones finales de 0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/ml en el primer experimento realizado una vez por duplicado. Se añadió ASP2138 a 50 µL/pozo para alcanzar concentraciones finales de 0, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng/ml en el segundo experimento realizado una vez por triplicado.

25 La citotoxicidad se evaluó mediante citometría de flujo. MIA PaCa-2 y PBMC se tiñeron con 7-amino-actinomicina D (7-AAD; BD Biosciences) en el primer experimento. En el segundo experimento se tiñeron con 7-AAD y anticuerpo PE-anti-humano CD45 (BD Biosciences). Las células GFP positivas y 7-AAD negativas, definidas como células diana vivas, se contaron con un citómetro de flujo MACSQuant® Analyzer 10 y se analizaron con el

software FlowJo. El porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$100 \times [1 - (\text{número de células diana vivas de cada pozo}) / (\text{número de células diana vivas de pozos individuales tratados con } 0 \text{ ng/ml de ASP2138})]$.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

5 Se investigó la citotoxicidad de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudina18.2 y CD3 humanas, en combinación con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel (agentes quimioterapéuticos) en ensayos de citotoxicidad de células T redirigida (RTCC). Se utilizó como célula diana MIA PaCa-2_GFP_CLDN18.2_27 (MIA PaCa-2), un subclon de línea celular de carcinoma pancreático que expresa claudina18.2 humana después de la transducción, tratada con o sin agentes quimioterapéuticos.

10 La citometría de flujo reveló que la expresión de claudina18.2 humana en las células diana aumentó después del tratamiento con agentes quimioterapéuticos (Figuras 2 y 4). ASP2138 mostró una citotoxicidad dependiente de la concentración contra las células MIA PaCa-2 con o sin tratamiento quimioterapéutico (Figuras 3 y 5). Además, la curva concentración-respuesta de la citotoxicidad mediada por ASP2138 contra las células MIA PaCa-2 tratadas con agentes quimioterapéuticos se desplazó hacia la izquierda y se desplazó hacia arriba en comparación con la curva sin tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Este estudio demostró que el tratamiento con agentes quimioterapéuticos aumentó la expresión de claudina18.2 y se descubrió que mejora tanto la potencia como la eficacia de ASP2138 en la citotoxicidad contra células tumorales humanas que expresan claudina18.2.

Ejemplo 2: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con clorhidrato de gemcitabina y paclitaxel en un modelo de ratón knock-in CD3ε humano portador del tumor B16-F10 que expresa CLDN18.2 en ratones

OBJETIVOS

25 Este estudio se llevó a cabo para examinar el efecto de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudina18.2 (CLDN18.2) y CD3 que comprende cuatro cadenas

polipeptídicas de acuerdo con las SEQ ID NO: 27, 28, 29 y 29, combinado con clorhidrato de gemcitabina (gemcitabina) y paclitaxel en el modelo de ratón knock-in CD3ε humano (hCD3ε KI) portador del tumor B16–F10 (B16F10_mCLDN18.2) que expresa claudina18.2 en ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Artículos de prueba

ASP2138 (Lote N° PDB00743–BDS; Astellas Pharma Inc., Tokio, Japón) y gemcitabina (Eli Lilly and Company, Indianápolis, IN, EE.UU.) se disolvieron en solución salina amortiguadora con fosfato (PBS). El paclitaxel (LC Laboratories, Woburn, MA, EE.UU.) se disolvió en etanol 50 % y Cremophor® 50 % para obtener una solución de 10 mg/ml y se
10 diluyó con PBS.

Línea celular

B16–F10, una línea celular de melanoma de piel de ratón, se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). B16F10_mCLDN18.2 se estableció en Astellas Pharma Inc. a partir de B16–F10 por transfección de CLDN18.2 de ratón y se
15 cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 2 mg/ml de G418 a 37°C en CO₂ 5 %.

Animales

Se utilizaron ratones macho hCD3ε KI de nueve semanas de edad, adquiridos a Biocytogen Jiangsu Co., Ltd (Jiangsu, China) y criados en Astellas Pharma Inc. Este estudio
20 fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Astellas Pharma Inc., Centro de Investigación de Tsukuba, acreditado por AAALAC International.

Inoculación del tumor

Las células B16F10_mCLDN18.2 se suspendieron en PBS a $4,0 \times 10^6$ células/ml y se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones de 9 semanas de edad a razón de 2,0

× 10⁵ células/50 µL/cabeza.

Administración y medición

5 Tres días después de la inoculación de las células B16F10_mCLDN18.2, se asignaron ratones con volúmenes tumorales medios similares entre los grupos (n=15), y se inició la administración de los artículos de prueba a partir del día siguiente. El primer día de la administración se definió como día 0.

A continuación se enumeran los cuatro grupos utilizados en el estudio:

Grupo 1: vehículo

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de PBS en el día 0, 3, 7 y 10.

10 Grupo 2: ASP2138

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,01 mg/kg) en el día 0 y 7, y la administración intraperitoneal de PBS en el día 3 y 10.

Grupo 3: quimioterapia

15 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de paclitaxel (10 mg/kg) en el día 0 y 7, y administración intraperitoneal de gemcitabina (40 mg/kg) en el día 0, 3, 7 y 10.

Grupo 4: combinación

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,01 mg/kg) y paclitaxel (10 mg/kg) en el día 0 y 7, y administración intraperitoneal de gemcitabina (40 mg/kg) en el día 0, 3, 7 y 10.

20 Se midieron los diámetros tumorales y los pesos corporales en el día -1, 3, 7, 10 y 14

con un calibre y una balanza estándar, respectivamente. Se usaron las mediciones del día -1 para el análisis como día 0. El volumen tumoral [mm³] se calculó con la fórmula:

$$(\text{Longitud del eje largo del tumor [mm]}) \times (\text{Longitud del eje corto del tumor [mm]})^2 \times 0,5$$

5 El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% Inh) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = 100 \times (1 - [\text{volumen tumoral medio en el día 14} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en cada grupo} / [\text{volumen tumoral medio en el día 14} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en el grupo de vehículo})$$

Análisis estadístico

10 Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM del volumen tumoral y el peso corporal. Los volúmenes tumorales medios en el día 14 del Grupo 2 y Grupo 3 se compararon con el Grupo 4 por separado usando prueba t de Student no apareada. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Se utilizó GraphPad Prism (ver. 8.0.2, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para procesar los datos.

15 Resultados y conclusión

20 Se investigó el efecto antitumoral de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudina18.2 (CLDN18.2) y CD3, en combinación con clorhidrato de gemcitabina (gemcitabina) y paclitaxel (quimioterapia) en el modelo de ratón knock-in CD3ε humano (hCD3ε KI) portador del tumor B16-F10 (B16F10_mCLDN18.2) que expresa CLDN18.2 en ratón. A partir de 4 días después de la inoculación de B16F10_mCLDN18.2, se administraron ASP2138 (0,01 mg/kg) y paclitaxel (10 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0 y 7, y gemcitabina (40 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0, 3, 7 y 10. El crecimiento tumoral fue inhibido por ASP2138 (0,01 mg/kg) y paclitaxel (10 mg/kg).

25 El crecimiento tumoral se inhibió mediante la administración de ASP2138 o quimioterapia en 74 % o 64 % el día 14, respectivamente. La combinación de ASP2138 y

quimioterapia inhibió el crecimiento tumoral en un 97 % el día 14, y no se observaron diferencias en el cambio de peso corporal entre los grupos (Figura 7). Los volúmenes tumorales en el grupo de combinación fueron significativamente menores que los del grupo tratado con ASP2138 o con quimioterapia (Figura 6).

5 Este estudio demostró que el tratamiento combinado de ASP2138 y quimioterapia produjo un aumento de la eficacia antitumoral en comparación con la monoterapia de ASP2138 o quimioterapia en el modelo de ratón hCD3ε KI portador de tumor B16F10_mCLDN18.2.

10 **Ejemplo 3: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con 5-fluorouracilo y Oxaliplatino en un modelo de ratón CD3ε knock-in humano portador del tumor MC38 que expresa CLDN18.2 humana**

OBJETIVOS

15 Este estudio se llevó a cabo para examinar el efecto de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para la claudina18.2 (CLDN18.2) y CD3 que comprende cuatro cadenas polipeptídicas de acuerdo con las SEQ ID NO: 27, 28, 29, y 29, combinado con 5-fluorouracilo y oxaliplatino (FOLFOX) en un modelo de ratón CD3ε knock-in humano (hCD3ε KI) portador del tumor MC38 (MC38_hCLDN18.2) que expresa CLDN18.2 humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

20 **Artículos de prueba**

ASP2138 (Lote N° PDB00743-BDS; Astellas Pharma Inc., Tokio, Japón) y 5-fluorouracilo (Lote No. 22501SF; Kyowa Kirin Co., Ltd., Tokio, Japón) y oxaliplatino (Lote N° XHDFDA; Yakult Honsha Co., Ltd., Tokio, Japón) se disolvieron en solución salina amortiguadora con fosfato (PBS).

Línea celular

MC38, una línea celular de adenocarcinoma de colon de ratón, se obtuvo de la American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA.). MC38_hCLDN18.2 se estableció en Astellas Pharma Inc. a partir de MC38 por transducción de CLDN18.2 humana y se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 6 µg/ml de blasticidina a 37°C en CO₂ 5 %.

Animales

Se utilizaron ratones hCD3ε KI, adquiridos a Biocytogen Jiangsu Co., Ltd (Jiangsu, China) y criados en Astellas Pharma Inc. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Astellas Pharma Inc., Centro de Investigación de Tsukuba, acreditado por AAALAC International

Inoculación del tumor

Las células MC38_hCLDN18.2 se suspendieron en PBS a $4,0 \times 10^6$ células/ml y se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones macho de 7 semanas de edad a razón de $2,0 \times 10^5$ células/50 µL/cabeza.

Administración y medición

Cinco días después de la inoculación de las células MC38_hCLDN18.2, se asignaron ratones con volúmenes tumorales medios similares entre los grupos (n=15), y se inició la administración de los artículos de prueba a partir del día siguiente. El primer día de la administración se definió como día 0.

Los cuatro grupos usados en el estudio se listan a continuación:

Grupo 1: vehículo

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de PBS en los días 0, 4, 7 y 11.

Grupo 2: ASP2138

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y administración intraperitoneal de PBS en los días 4 y 11.

Grupo 3: FOLFOX

- 5 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de 5-fluorouracilo (25 mg/kg) y oxaliplatino (2,5 mg/kg) en los días 0, 4, 7 y 11.

Grupo 4: combinación

- 10 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y administración intraperitoneal de 5-fluorouracilo (25 mg/kg) y oxaliplatino (2,5 mg/kg) en los días 0, 4, 7 y 11.

Se midieron los diámetros tumorales y los pesos corporales en los días -1, 4, 7, 11 y 14 con un calibre y una balanza, respectivamente. Se usaron las mediciones del día -1 para el análisis como día 0.

El volumen tumoral [mm³] se calculó con la fórmula:

- 15 $(\text{Longitud del eje largo del tumor [mm]}) \times (\text{Longitud del eje corto del tumor [mm]})^2 \times 0,5$

El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% Inh) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

- 20 $\% \text{ Inh} = 100 \times (1 - [\text{volumen tumoral medio en el día 14} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en cada grupo} / [\text{volumen tumoral medio en el día 14} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en el grupo de vehículo})$

Análisis estadístico

Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM del volumen tumoral y el peso corporal. Los volúmenes tumorales medios en el día 14 del Grupo 2 y Grupo 3 se compararon con el Grupo 4 por separado usando la prueba t de Student. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Se usó GraphPad Prism (ver. 10.1.2 GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para procesar los datos.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Se investigó el efecto antitumoral de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudina18.2 humana (hCLDN18.2) y CD3, en combinación con 5-fluorouracilo y oxaliplatino (FOLFOX) en un modelo de ratón CD3 ϵ knock-in humano (hCD3 ϵ KI) portador del tumor MC38 (MC38_hCLDN18.2) que expresa hCLDN18.2. A partir de los 6 días de la inoculación de MC38_hCLDN18.2, se administró ASP2138 (0,1 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg) y oxaliplatino (2,5 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0, 4, 7 y 11. El crecimiento tumoral se inhibió mediante la administración de ASP2138 o FOLFOX en 37 % o 39 % el día 14, respectivamente. La combinación de ASP2138 y FOLFOX inhibió el crecimiento tumoral en 60 % el día 14, y no se observaron diferencias en el cambio de peso corporal entre los grupos (Figura 9). Los volúmenes tumorales en el grupo de combinación fueron significativamente menores que los del grupo tratado con ASP2138 o con FOLFOX (Figura 8).

Este estudio demostró que el tratamiento combinado de ASP2138 y FOLFOX produjo un aumento significativo de la eficacia antitumoral en comparación con la monoterapia de ASP2138 o FOLFOX en un modelo de ratón hCD3 ϵ KI portador de tumor MC38_hCLDN18.2

En este ejemplo, se administró a ratones una combinación de 5-fluorouracilo y oxaliplatino y se hizo referencia a la administración de FOLFOX en este contexto. Es evidente para el experto que el régimen de administración de FOLFOX, en sentido estricto, también incluye la administración de ácido folínico, que no se administró en este ejemplo. El experto reconocerá que los resultados de este ejemplo observados con la combinación de 5-fluorouracilo y oxaliplatino también se aplican cuando se administra adicionalmente ácido folínico.

Ejemplo 4: Efecto antitumoral de ASP2138 en combinación con 5-fluorouracilo,

oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano en un modelo de ratón CD3ε knock-in humano portador del tumor MC38 que expresa CLDN18.2 humana

OBJETIVOS

5 Este estudio se llevó a cabo para examinar el efecto de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para la claudina18.2 (CLDN18.2) y CD3 que comprende cuatro cadenas polipeptídicas de acuerdo con las SEQ ID NO: 27, 28, 29, y 29, combinado con 5-fluorouracilo, oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano (FOLFIRINOX) en un modelo de ratón CD3ε knock-in humano (hCD3ε KI) portador del tumor MC38 (MC38_hCLDN18.2) que expresa claudina18.2 humana.

10 MATERIALES Y MÉTODOS

Artículos de prueba

ASP2138 (Lote N° PDB00743-BDS; Astellas Pharma Inc., Tokio, Japón) y 5-fluorouracilo (Lote N° 22501SF; Kyowa Kirin Co., Ltd., Tokio, Japón), oxaliplatino (Lote N° XHDFDA; Yakult Honsha Co., Ltd., Tokio, Japón) y clorhidrato de irinotecano (Lote N° 15 IR22208B; Pfizer Japón Inc., Tokio, Japón) se disolvieron en solución salina amortiguadora con fosfato (PBS).

Línea celular

20 MC38, una línea celular de adenocarcinoma de colon de ratón, se obtuvo de la American Type Culture Collection (Bethesda, MD, USA.). MC38_hCLDN18.2 se estableció en Astellas Pharma Inc. a partir de MC38 por transducción de CLDN18.2 humana y se cultivó en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 6 µg/ml de blasticidina a 37°C en CO₂ 5 %.

Animales

Se utilizaron ratones hCD3ε KI, adquiridos a Biocytogen Jiangsu Co., Ltd (Jiangsu,

China) y criados en Astellas Pharma Inc. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Astellas Pharma Inc., Centro de Investigación de Tsukuba, acreditado por AAALAC International

Inoculación del tumor

- 5 Las células MC38_hCLDN18.2 se suspendieron en PBS a $4,0 \times 10^6$ células/ml y se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones macho de 5 semanas de edad a razón de $2,0 \times 10^5$ células/50 μ L/cabeza.

Administración y medición

- 10 Cinco días después de la inoculación de las células MC38_hCLDN18.2, se asignaron ratones con volúmenes tumorales medios similares entre los grupos (n=15), y se inició la administración de 100 μ L/cabeza de artículos de prueba a partir del día siguiente. El primer día de la administración se definió como día 0.

Los cuatro grupos usados en el estudio se listan a continuación:

Grupo 1: vehículo

- 15 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de PBS en los días 0, 4 y 7.

Grupo 2: ASP2138

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y administración intraperitoneal de PBS en el día 4.

Grupo 3: FOLFIRINOX

- 20 Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de 5-fluorouracilo (25 mg/kg), oxaliplatino (2,5 mg/kg) y clorhidrato de irinotecano (10 mg/kg) en los días 0, 4 y 7.

Grupo 4: combinación

Los ratones recibieron la administración intraperitoneal de ASP2138 (0,1 mg/kg) en los días 0 y 7, y administración intraperitoneal de 5-fluorouracilo (25 mg/kg), oxaliplatino (2,5 mg/kg) y clorhidrato de irinotecano (10 mg/kg) en los días 0, 4 y 7.

- 5 Se midieron los diámetros tumorales y los pesos corporales en los días -1, 4, 7 y 11 con un calibre y una balanza, respectivamente. Se usaron las mediciones del día -1 para el análisis como día 0.

Volumen tumoral [mm³] se calculó con la fórmula:

$$(\text{Longitud del eje largo del tumor [mm]}) \times (\text{Longitud del eje corto del tumor [mm]})^2 \times 0,5$$

- 10 El porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% Inh) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = 100 \times (1 - [\text{volumen tumoral medio en el día 11} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en cada grupo} / [\text{volumen tumoral medio en el día 11} - \text{volumen tumoral medio en el día 0}] \text{ en el grupo de vehículo})$$

15 **Análisis estadístico**

Los valores se expresan como la media $\pm$ SEM del volumen tumoral y el peso corporal. Los volúmenes tumorales medios en el día 11 del Grupo 2 y Grupo 3 se compararon con el Grupo 4 por separado usando la prueba t de Student. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Se usó GraphPad Prism (ver. 10.1.2 GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para procesar los datos.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Se investigó el efecto antitumoral de ASP2138, un anticuerpo biespecífico para claudina18.2 humana (hCLDN18.2) y CD3, en combinación con 5-fluorouracilo, oxaliplatino y

clorhidrato de irinotecano (FOLFIRINOX) en un en un modelo de ratón CD3ε knock-in humano (hCD3ε KI) portador del tumor MC38 (MC38_hCLDN18.2) que expresa claudina18.2 humana. A partir de los 6 días de la inoculación de MC38_hCLDN18.2, se administró ASP2138 (0,1 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0 y 7, y 5-fluorouracilo (25 mg/kg), oxaliplatino (2,5 mg/kg) y clorhidrato de irinotecano (10 mg/kg) por vía intraperitoneal los días 0, 4 y 7. El crecimiento tumoral se inhibió mediante la administración de ASP2138 o FOLFIRINOX en 59 % o 38 % el día 11, respectivamente. La combinación de ASP2138 y FOLFIRINOX inhibió el crecimiento tumoral en 77 % el día 11, y no se observaron diferencias en el cambio de peso corporal entre los grupos (Figura 11). Los volúmenes tumorales del grupo de combinación fueron significativamente menores que los del grupo tratado con ASP2138 o tratado con FOLFIRINOX (Figura 10).

Este estudio demostró que el tratamiento combinado de ASP2138 y FOLFIRINOX produjo un aumento significativo de la eficacia antitumoral en comparación con la monoterapia de ASP2138 o FOLFIRINOX en un modelo de ratón hCD3ε KI portador del tumor MC38_hCLDN18.2.

En este ejemplo, se administró a los ratones una combinación de 5-fluorouracilo, oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano y se hizo referencia a la administración de FOLFIRINOX en este contexto. Es evidente para el experto que el régimen de administración de FOLFIRINOX, en sentido estricto, también incluye la administración de ácido folínico, que no se administró en este ejemplo. El experto reconocerá que los resultados de este ejemplo observados con la combinación de 5-fluorouracilo, oxaliplatino y clorhidrato de irinotecano también se aplican cuando se administra adicionalmente ácido folínico.

Secuencias descritas en la presente:

Número de secuencia 1:

MAVTACQGLG FVVSLLIGIAG IIAATCMDQW STQDLYNNPV TAVFNYQGLW RSCVRESSGF 60
TECRGYFTLL GLPAMLQAVR ALMIVGIVLG AIGLLVSIFA LKCIRIGSME DSAKANMTLT 120
SGIMFIVSGL CAIAGVSVFA NMLVTNFWMS TANMYTGMGG MVQTVQTRYT FGAALFVGWV 180
AGGLTLIGGV MMCIACRGLA PEETNYKA VS YHASGHSVAY KPGGFKASTG FGSNTKNKKI 240
YDGGARTEDE VQSYP SKHDY V 261

Número de secuencia 2:

GKPGSGKPGS GKPGSGKPGS 20

Número de secuencia 3:

KTHTCPPCP 9

5 Número de secuencia 4:

GGGSGGGGS KTHTCPPCP 19

Número de secuencia 5:

GGGSGGGGS 10

Número de secuencia 6:

10 EPKSCDKTHT CPPCP 15

Número de secuencia 7:

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 60
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS DTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPPVAGP 120
SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVKH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEEYNS 180
15 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM 240
TKNQVSLTCD VSGFYPSDIA VEWESDGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWE 300
QGDVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 329

Número de secuencia 8:

APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVKHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP 60
20 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL 120
PPSREQMTKN QVKLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT 180
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK 216

Número de secuencia 9:

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD 60
25 SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC 107

Número de secuencia 10:

SYWIN 5

Número de secuencia 11:

NIYPSDSYTN YNQKFQG 17

5 Número de secuencia 12:

SWRGNSFDY 9

Número de secuencia 13:

KSSQSLNSG NQKNILT 17

Número de secuencia 14:

10 WASTRES 7

Número de secuencia 15:

QNDYSPFT 9

Número de secuencia 16:

15 EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKASGYTFT SYWINWVRQM PGKGLEWMGN IYPSDSYTN 60
NQKFQGHVTI SVDKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCTRSW RGNSFDYWGQ GTLTVVSS 118

Número de secuencia 17:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSL NSGNQKNILT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR 60
ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PFTFGSGTKL EIK 113

Número de secuencia 18:

20 TYAMN 5

Número de secuencia 19:

HGNFGDSYVS WFAY 14

Número de secuencia 20:

GSSTGAVTTS NYAN 14

Número de secuencia 21:

GTNKRAP 7

Número de secuencia 22:

5 ALWYSNHWV 9

Número de secuencia 23:

RIRSKANNYA TYYADSVKG 19

Número de secuencia 24:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCGSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGKSPRGLI GG TNKRAPGV 60
10 PARFSGSLLG GKAALTISGA QPEDEADYYC ALWYSNHWVF GGGTKLTVL 109

Número de secuencia 25:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWRQA PGKGLEWVGR IRSKANNYAT 60
YYADSVKGRF TISRDDSKNT LILQMNSLRA EDTAVYYCVR HGNFGDSYVS WFAYWGQGT L 120
VTVSS 125

15 Número de secuencia 26:

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCGSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGKSPRGLI GG TNKRAPGV 60
PARFSGSLLG GKAALTISGA QPEDEADYYC ALWYSNHWVF GGGTKLTVLG KPGSGKPGSG 120
KPGSGKPGSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFST YAMNWRQAP GKGLEWVGRI 180
RSKANNYATY YADSVKGRFT ISRDDSKNTL ILQMNSLRAE DTAVYYCVRH GNFGDSYVSW 240
20 FAYWGQGT LV TVSS 254

Número de secuencia 27:

EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKASGYTFT SYWINWVRQM PGKGLEWMGN IYPSDSYTN 60
NQKFQGHVTI SVDKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCTRSW RGNSFDYWGQ GTLVTVSSAS 120
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVT VSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180
25 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSDT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPPVAGPSV 240
FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVKHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEEYNSTY 300
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK 360

NQVSLTCDVS GFYPSDIAVE WESDGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWEQG 420
DVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK 447

Número de secuencia 28:

EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKASGYTFT SYWINWVRQM PGKGLEWMGN IYPSDSYTN 60
5 NQKFQGHVTI SVDKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCTRSW RGNSFDYWGQ GTLVTVSSAS 120
TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180
YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CGGGGSGGGG SQAVVTQEPS 240
LTVSPGGTVT LTCGSSTGAV TTSNYANWVQ QKPGKSPRGL IGGTNKRAPG VPARFSGSLL 300
GGKAALTISG AQPEDeadYY CALWYSNHWV FGGGTKLTVL GKPGSGKPGS GKPGSGKPGS 360
10 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWRQA PGKGLEWVGR IRSKANNYAT 420
YYADSVKGRF TISRDDSKNT LILQMNSLRA EDTAVYYCVR HGNFGDSYVS WFAVWGQGT 480
VTVSSGGGGS GGGGSKTHTC PPCAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVK 540
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA 600
LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREQ MTKNQVKLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP 660
15 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 720

Número de secuencia 29:

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLN NSGNQKNILT WYQQKPGQPP KLLIYWASTR 60
ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQNDYSY PFTFGSGTKL EIKRTVAAPS 120
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS 180
20 LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC 220