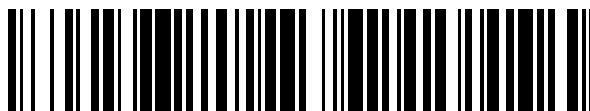


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 753**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2014 PCT/EP2014/000244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15113576**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2014 E 14701918 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3099706**

54 Título: **Mimótopos peptídicos de claudina 18.2 y sus usos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2019

73 Titular/es:

**BIONTECH AG (33.3%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE;
JPT PEPTIDE TECHNOLOGIES GMBH (33.3%) y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;
DANESCHDAR, MATIN;
SCHMOLDT, HANS-ULRICH;
PLUM, LAURA-MARIE;
FIEDLER, MARKUS;
REIMER, ULF y
SCHNATBAUM, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 699 753 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mimótopos peptídicos de claudina 18.2 y sus usos

5 La presente invención proporciona moléculas que mimetizan determinantes antigénicos de la proteína integral transmembrana claudina 18.2 (CLDN18.2). Estas moléculas compiten con CLDN18.2 por la unión a un dominio de unión CLDN18.2, por ejemplo, un dominio de unión CLDN18.2 de un anticuerpo, y son capaces de detectar anticuerpos contra CLDN18.2. Los mimótopos que se describen en la presente descripción pueden usarse para generar o inhibir respuestas inmunitarias en animales y preferentemente en humanos. Adicionalmente, pueden servir como herramientas para la detección de anticuerpos anti CLDN18.2, dominios de unión CLDN18.2 o formatos alternativos de anticuerpos en las muestras biológicas, así como también para propósitos de purificación de dichas moléculas.

15 Las claudinas son proteínas integrales de membrana localizadas dentro de las uniones estrechas de los epitelios y endotelios. Se predice que las claudinas tienen cuatro segmentos transmembrana con dos lazos extracelulares, y N- y C- terminales ubicados en el citoplasma. La familia claudina (CLDN) de proteínas transmembrana desempeña un papel crítico en el mantenimiento de las uniones estrechas epiteliales y endoteliales y pueden desempeñar también un papel en el mantenimiento del citoesqueleto y en la señalización celular.

20 La molécula de claudina 18 (CLDN18) es una proteína integral transmembrana (tetraspanina) que tiene cuatro regiones hidrofóbicas que abarcan la membrana y dos lazos extracelulares (lazo 1 conformado por la región hidrofóbica 1 y la región hidrofóbica 2; lazo2 conformado por las regiones hidrofóbicas 3 y 4). CLDN18 existe en dos diferentes variantes de corte y empalme, que se describen en ratón y en humano (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90,2001). Las variantes de corte y empalme (Genbank número de acceso: variante de corte y empalme 1 (CLDN18.1): NP_057453, NM_016369, y variante de corte y empalme 2 (CLDN18.2): NM_001002026, NP_001002026) tienen un peso molecular de aproximadamente 27,9 / 27,72 kD. Las variantes de corte y empalme CLDN18.1 y CLDN18.2 difieren en la porción del N-terminal que comprende la primera región transmembrana (TM) y el lazo1, mientras que la secuencia primaria de la proteína del C-terminal es idéntica.

30 En tejidos normales, no hay expresión detectable de CLDN18.2 con la 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 presenta frecuentemente en la superficie de las células cancerosas gástricas humanas. Además, este antígeno pantumoral se activa de manera ectópica a niveles significativos en adenocarcinomas de esófago, páncreas y pulmón. La proteína CLDN18.2 también se localiza en la metástasis de los ganglios linfáticos de los adenocarcinomas de cáncer gástrico y en la metástasis a distancia, especialmente en el ovario (llamados tumores de Krukenberg).

40 IMAB362 es un anticuerpo monoclonal IgG1 altamente específico para tumores actualmente en desarrollo clínico entre otros para el tratamiento de cáncer avanzado gastroesofágico y estomacal [Sahin, U. y otros, Clin. Cancer Res. 2008, 14, 7624-7634; Woll, S. y otros, Int. J. Cancer 2013, DOI: 10.1002/ijc.28400]. El anticuerpo se dirige contra la diana de la superficie de la célula específica del cáncer Claudina 18 isoforma 2 (CLDN18.2). Se ha conducido un ensayo de fase I y fase IIa en pacientes en etapa tardía con tratamiento previo múltiple con cáncer gastroesofágico avanzado mediante el uso de IMAB362 como agente único y muestra tolerabilidad y actividad antitumoral. En un ensayo de fase IIb aleatorizado en curso, IMAB362 se combina con quimioterapia estándar para una primera línea de tratamiento de cáncer gastroesofágico [Schuler, M. H. y otros, J. Clin. Oncol. 2013, 31 (suplemento; resumen 4080)].

50 Para el desarrollo de IMAB362 hacia el uso clínico la detección y cuantificación del anticuerpo después de la aplicación a animales y pacientes es importante para la caracterización de las propiedades ADME y PK. Típicamente, los ensayos basados en ELISA se aplican para este propósito mediante el uso del antígeno correspondiente. Desafortunadamente, las proteínas transmembrana son a menudo difíciles de producir y manejar debido a su naturaleza peculiar como estructuras embebidas en la membrana. [Scott, D. J. y otros, Curr. Opin. Chem. Biol. 2013, 17, 427-435]. Este obstáculo puede superarse mediante el uso de anticuerpos antiidiotipo que se unen específicamente a la región de unión a antígeno del anticuerpo terapéutico. Sin embargo, la generación de tales anticuerpos antiidiotipo requiere tiempo y es costosa. Por lo tanto, los mimótopos como estructuras más fáciles de preparar se consideran sustitutos útiles para mimetizar el antígeno de longitud completa, lo que permite la unión estrecha específica del anticuerpo terapéutico. Los mimótopos pueden ser proteínas, pero también oligopéptidos [Casey, J. L. y otros, J. Clin. Microbiol. 2006, 44, 764-771; Kieber-Emmons, T., Immunol. Res. 1998, 17, 95-108; Tang, Y., y otros, J. Biol. Chem. 1999, 274, 27371-27378; Wagner, S. y otros, Clin. Cancer Res. 2008, 14, 8178-8183].

60 Como una alternativa al ELISA de proteínas, el ELISA de péptidos es una técnica que se usa cada vez más. [Velumani, S. y otros, PLoS. One 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0020737]. Los péptidos son fácilmente accesibles por síntesis química, muestran mayor estabilidad y son más fáciles de manejar en comparación con las proteínas. En general, el ELISA de péptidos permite el análisis de las interacciones proteína/proteína al nivel de secuencia de aminoácidos, por ejemplo, para la definición de los sitios de interacción de proteínas. Específicamente los péptidos de unión - o los mimótopos basados en péptidos - para el ELISA de péptidos pueden descubrirse con varios enfoques que pueden ser tanto enfoques basadas en el conocimiento como basadas en bibliotecas aleatorias. La presentación en fagos es una técnica bien establecida para el tamizaje de grandes bibliotecas de proteínas o péptidos que a menudo producen

patrones de unión fuertes para proteínas relacionados con enfermedades o anticuerpos [Molek, P. y otros, moléculas 2011, 16, 857-887; Szardenings, M., Transduct. Res. 2003, 23, 307-349]. Sin embargo, en algunos casos es necesario optimizar las afinidades o las propiedades fisicoquímicas de estos péptidos hallados. En la presente, los microarreglos de péptidos ofrecen un enfoque eficiente. Miles de péptidos pueden tamizarse de manera económica en paralelo que requiere solo pequeñas cantidades del analito preciado. En adición, los ensayos en microarreglos de péptidos pueden prepararse de manera rápida debido a que la lectura se logra de manera frecuente por métodos estandarizados basados en la fluorescencia, lo que permite un fondo bajo cuando se usan superficies de vidrio [Lorenz, P. y otros, Methods Mol. Biol. 2009, 524, 247-258; Nahtman, T. y otros, J. Immunol. Methods 2007, 328, 1-13; Thiele, A. y otros, Methods Mol. Biol. 2009, 570, 19-65; Pai, J. y otros, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 19287-19296].

Un objeto de la invención es preparar estructuras que puedan servir como sustitutos para mimetizar el antígeno de longitud completa CLDN18.2 y que estén disponibles en un formato que sea compatible con los formatos bioquímicos para ensayos analíticos y procedimientos de purificación.

De acuerdo con la presente enseñanza, se reporta el desarrollo sistemático de mimótopos basados en péptidos para CLDN18.2 que se unen al candidato a fármaco IMAB362. El proceso de descubrimiento y optimización del mimótopo se realizó a través de un enfoque combinado de tamizaje y maduración de la afinidad mediante el uso de la presentación en fagos seguido por una caracterización de la relación estructura actividad (SAR) de los péptidos hallados basada en microarreglo de péptidos lo que conduce a la optimización rápida de sus propiedades de unión. Los mimótopos resultantes mostraron unirse de manera fuerte y específica y ser adecuados para la detección del anticuerpo en suero humano y murino.

La identificación y aislamiento de moléculas que mimetizan determinantes antigénicos de CLDN18.2 proporciona ventajas y beneficios significativos. El uso de moléculas que mimetizan epítomos, y en particular mimótopos basados en péptidos, como antígenos de diagnóstico es ventajoso debido a que permite enfocarse en especificidades individuales relevantes y evita los epítomos sin importancia diagnóstica presentes en los antígenos complejos. Los péptidos de alta calidad y estabilidad pueden producirse de manera económica y reproducible y se aplican fácilmente al ELISA, así como también otros formatos.

Resumen

La presente enseñanza proporciona un mimótopo peptídico de claudina 18.2 (CLDN18.2). El mimótopo peptídico de la invención y sus usos se definen en las reivindicaciones. Como se describe en la presente descripción, el mimótopo peptídico es un mimético estructural de un epítomo lineal o conformacional de CLDN18.2. En una modalidad de la presente enseñanza, el mimótopo peptídico es un mimético estructural de un epítomo en el dominio extracelular de CLDN18.2.

En una modalidad de la enseñanza, el mimótopo peptídico tiene una capacidad de unión a un dominio de unión CLDN18.2 y/o compete con CLDN18.2 por la unión a un dominio de unión CLDN18.2. En una modalidad, el dominio de unión CLDN18.2 se comprende por un agente de unión a CLDN18.2. En una modalidad, el agente de unión a CLDN18.2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para CLDN18.2, una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un dominio de unión a CLDN18.2 y un receptor de antígeno quimérico (CAR). En una modalidad, el agente de unión a CLDN18.2 se selecciona del grupo que consiste en moléculas de unión artificiales (andamiajes) que incluyen, pero no se limitan a nanocuerpos, anticuerpos, anticualinas, DARPins, monocuerpos, avímeros, y microcuerpos. En una modalidad, la molécula biespecífica es un anticuerpo biespecífico. En una modalidad, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla. En una modalidad, el agente de unión se une a un epítomo en el dominio extracelular de CLDN18.2. En una modalidad, dicha unión es una unión específica.

En una modalidad, la molécula biespecífica o multiespecífica comprende un primer dominio de unión que se une a CLDN18.2 y un segundo dominio de unión que une a una célula T. En una modalidad, la molécula biespecífica o multiespecífica comprende un primer dominio de unión que se une a CLDN18.2 y un segundo dominio de unión que une a CD3. En una modalidad, dicho segundo dominio de unión que une a CD3 se une a la cadena épsilon de CD3. En una modalidad, dicho CD3 se expresa en la superficie de una célula T. En una modalidad, la unión de dicho agente de unión a CD3 en las células T resulta en la proliferación y/o activación de dichas células T, en donde dichas células T activadas preferentemente liberan factores citotóxicos, por ejemplo, perforinas y granzimas, e inician la citólisis y apoptosis de las células cancerosas.

En una modalidad, el dominio de unión CLDN18.2 comprende un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una especificidad para CLDN18.2 (VH(CLDN18.2)) y un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para CLDN18.2 (VL(CLDN18.2)). En una modalidad, dicho VH(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 2 o un fragmento de esta o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento y la VL(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 3 o un fragmento de esta o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,

5 Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y

10 Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val.

15 En una modalidad, el mimótoto peptídico de la presente enseñanza comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr,
 His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg,
 His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg,
 His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp,
 20 His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val,
 His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val,
 His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp,
 His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu,
 His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu,
 25 His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr,
 His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr,
 His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp,
 Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr,
 His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp, y

30 un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

En una modalidad, el mimótoto peptídico de la presente enseñanza comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

35 Cys Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr Cys,
 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg Cys,
 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg Cys,
 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp Cys,
 Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val Cys,
 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val Cys,
 40 Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp Cys,
 Cys His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu Cys,
 Cys His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu Cys,
 Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr Cys,
 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys,
 45 Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp Cys,
 Cys Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys,
 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp Cys, y

un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

50 En una modalidad, el mimótoto peptídico de la presente enseñanza comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

Ala Cys Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr Cys Gly,
 Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg Cys Gly,
 Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg Cys Gly,
 55 Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp Cys Gly,
 Ala Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val Cys Gly,
 Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val Cys Gly,
 Ala Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp Cys Gly,
 Ala Cys His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu Cys Gly,
 60 Ala Cys His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu Cys Gly,
 Ala Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly,
 Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly,
 Ala Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp Cys Gly,
 Ala Cys Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly,
 65 Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp Cys Gly, y

un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

En una modalidad, el mimótopo peptídico de la presente enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos His Pro Asp. En una modalidad, el mimótopo peptídico de la presente enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos Tyr Leu His Pro Asp.

5 En una modalidad, el mimótopo peptídico de la presente enseñanza comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 Thr Pro Tyr His His Pro Asp Phe Pro Tyr Trp Phe,
 Tyr Leu His Pro Asp Tyr Pro,
 Tyr Leu His Pro Asp Val Met,
 10 Pro Arg Cys Lys Ser Glu Gly Pro His His Pro Asp Tyr Pro Asp Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Ile Cys
 Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly,
 Ala Cys Arg His Pro Asp His Leu Asp Cys,
 Ala Cys His Glu Thr His His Pro Asp Cys, y
 un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

15 En otras modalidades, el mimótopo peptídico de la presente enseñanza comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
 Ser Phe Arg Asp Met Asn Tyr Ser Asp Tyr Phe Met,
 His Ile Leu Pro Leu Tyr Pro,
 20 Ser Pro Tyr Met Pro Met Gln,
 Asp Arg Cys Trp Leu Glu Gln Trp Pro Cys Arg Arg Asp Ser Asp Ile Pro,
 Gln Thr Cys Asp His Asp Thr Arg His Pro Thr Gly Asp Asp Leu Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Gly Gly Asn Cys Ile Cys
 Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly, y
 un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

25 En una modalidad, el mimótopo peptídico se conjuga a al menos una pareja de fusión. En una modalidad, el mimótopo peptídico es parte de un polipéptido de fusión. En una modalidad, la pareja de fusión comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga. En una modalidad, la pareja de fusión comprende un reportero para un ensayo inmunológico. En una modalidad, el reportero se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, o una molécula fluorescente. En una modalidad, la pareja de fusión comprende una etiqueta.

30 En una modalidad, el mimótopo peptídico se estabiliza por una modificación covalente. Preferentemente, la modificación es una ciclación. En una modalidad, la ciclación es a través de un puente disulfuro, un lactámico, preferentemente un gammalactámico, u otro.

35 En una modalidad, los mimótopos peptídicos y las secuencias de aminoácidos de los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción se comprenden por una estructura que confiere rigidez al mimótopo peptídico o a la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el mimótopo peptídico o la secuencia de aminoácidos puede insertarse en un polipéptido o proteína y puede formar un lazo de dicho polipéptido o proteína. En una modalidad preferida particularmente, los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción son péptidos cíclicos y las secuencias de aminoácidos de los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción se comprenden por péptidos cíclicos.

40 En una modalidad, el mimótopo peptídico está presente en forma oligomérica o multimérica. En esta modalidad, dos o más mimótopos peptídicos de la enseñanza que pueden ser idénticos o diferentes pueden unirse o acoplarse por enlace covalente o no covalente, tal como a través de biotina/estreptavidina. Por tanto, los mimótopos peptídicos de la enseñanza pueden formar dímeros, trímeros, tetrámeros etc.

45 La presente invención además proporciona un ácido nucleico recombinante que codifica un mimótopo peptídico de la invención. En una modalidad, el ácido nucleico recombinante tiene la forma de un vector o la forma de ARN.

La presente invención además proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante de la invención.

50 La presente invención además proporciona un método para el ensayo de la presencia y/o la cantidad de CLDN18.2 en una muestra que comprende el uso del mimótopo peptídico de la invención. En una modalidad, el mimótopo peptídico se usa como un competidor de la CLDN18.2, por ejemplo, para la unión a un anticuerpo contra CLDN18.2

55 En particular, la presente invención proporciona un método para determinar si una muestra contiene CLDN18.2 que comprende proporcionar un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2, reaccionar el anticuerpo monoclonal con la muestra en una mezcla de reacción que contiene el mimótopo peptídico de la invención como un competidor, y determinar si la muestra contiene CLDN18.2.

60 La presente invención proporciona también un método para determinar si una muestra contiene CLDN18.2 que comprende: (a) incubar en una reacción la muestra, un anticuerpo monoclonal contra la CLDN18.2, y un mimótopo peptídico de la invención que es un competidor de la CLDN18.2 para el anticuerpo monoclonal; (b) detectar en la

reacción un complejo que consiste en la CLDN18.2 unida por el anticuerpo monoclonal y un complejo formado por el mimótopo y el anticuerpo monoclonal; y (c) comparar una cantidad de cada uno de los complejos en donde una disminución en la cantidad del complejo que comprende el mimótopo peptídico indica que la muestra contiene CLDN18.2.

5 En una modalidad de los métodos de la invención, el mimótopo peptídico se conjuga a una etiqueta o un reportero.

La presente invención además proporciona un método para el análisis de la presencia y/o la cantidad de agentes de unión a CLDN18.2 tal como anticuerpos CLDN18.2 en una muestra que comprende el uso del mimótopo peptídico de la invención. Preferentemente, el mimótopo peptídico se usa para capturar los agentes de unión a CLDN18.2 tal como anticuerpos CLDN18.2 en una muestra.

La presente invención además proporciona un método para capturar los agentes de unión a CLDN18.2 tal como anticuerpos CLDN18.2 en una muestra que comprende el uso del mimótopo peptídico de la invención.

15 En una modalidad, los métodos de la invención se realizan en el contexto de un inmunoensayo.

En particular, la presente invención proporciona un método de determinación de anticuerpos CLDN18.2 en una muestra que comprende el contacto de una muestra con al menos un mimótopo peptídico de la invención y el ensayo para la presencia o ausencia de complejos anticuerpo-mimótopo, en donde la presencia de los complejos anticuerpo-mimótopo es indicativo de la presencia de anticuerpos CLDN18.2 en la muestra.

20 En una modalidad de los métodos de la invención, el mimótopo peptídico se inmoviliza de manera liberable o no liberable en un soporte sólido.

25 La presente invención también proporciona un método de separación y/o purificación de los agentes de unión a CLDN18.2 mediante el uso del mimótopo peptídico de la invención. En esta modalidad, el mimótopo peptídico puede usarse en el contexto de la cromatografía de afinidad. En particular, el método puede comprender el contacto de una muestra con al menos un mimótopo peptídico de la invención y la separación de los complejos agente de unión a CLDN18.2-mimótopo de otros componentes de la muestra. En una modalidad, la presente invención proporciona un método de purificar un agente de unión a CLDN18.2, que comprende tratar una muestra que comprende el agente de unión a CLDN18.2 con un mimótopo peptídico de la invención inmovilizado, una etapa de lavado para separar los compuestos no deseados tales como impurezas, y una etapa de elución para obtener el agente de unión a CLDN18.2.

30 La presente invención además describe un reactivo o kit de prueba que comprende un mimótopo peptídico de la enseñanza. En una modalidad, el reactivo o kit de prueba es un reactivo o kit diagnóstico. En una modalidad, el mimótopo peptídico se conjuga a una etiqueta. De acuerdo con la enseñanza, una etiqueta puede seleccionarse del grupo que consiste en un compuesto radioactivo, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto electroactivo, un compuesto fluorescente, y un compuesto particulado directo.

35 El kit de prueba de la enseñanza puede además comprender al menos un reactivo adicional para realizar un inmunoensayo y/o las instrucciones para usar el kit para realizar un inmunoensayo.

40 La presente enseñanza además proporciona un dispositivo de ensayo que comprende un mimótopo peptídico de la enseñanza. En una modalidad, el dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. En una modalidad, el mimótopo peptídico se inmoviliza de manera liberable o no liberable en un soporte sólido.

45 La presente invención además proporciona un método para tratar un sujeto expuesto a un agente de unión a CLDN18.2, por ejemplo, con el objetivo de tratar el cáncer, en particular el cáncer que involucra células que expresan CLDN18.2, que comprende tratar el organismo con un mimótopo peptídico de la invención. En una modalidad, el mimótopo peptídico es antagonista al agente de unión a CLDN18.2. En una modalidad, el mimótopo peptídico neutraliza la unión del agente de unión a CLDN18.2 a CLDN18.2.

50 La presente invención además proporciona el mimótopo peptídico de la invención, el ácido nucleico recombinante de la invención o la célula huésped de la invención para su uso en terapia, en particular para su uso en tratar o prevenir cáncer en un paciente, en particular cáncer que involucra células que expresan CLDN18.2.

55 La presente enseñanza además proporciona una composición farmacéutica que comprende el mimótopo peptídico de la enseñanza, el ácido nucleico recombinante de la enseñanza o la célula huésped de la enseñanza.

60 La presente enseñanza además proporciona un método de tratar un paciente, por ejemplo, un paciente que tiene cáncer, en particular cáncer que involucra células que expresan CLDN18.2, dicho paciente preferentemente se expone a un agente de unión a CLDN18.2, que comprende la administración al paciente de la composición farmacéutica de la enseñanza.

65

La presente enseñanza además proporciona una composición vacunal que comprende un mimótopo peptídico de la enseñanza.

5 La presente enseñanza además proporciona un método para generar anticuerpos contra CLDN18.2 en un sujeto que comprende tratar el sujeto con un mimótopo peptídico de la enseñanza.

En una modalidad de todos los aspectos de la enseñanza, CLDN18.2 se expresa en una célula cancerosa, preferentemente en la superficie de una célula cancerosa.

10 De acuerdo con la enseñanza, las células cancerosas que expresan CLDN18.2 son preferentemente células cancerosas de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de la vesícula biliar, y la metástasis de estos, un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos.

15 En una modalidad de todos los aspectos de la enseñanza, preferentemente el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de la vesícula biliar, y metástasis de estos, un tumor de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos.

20 En una modalidad de todos los aspectos de la enseñanza, CLDN18.2 preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1.

25 Otras características y ventajas de la presente enseñanza serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Análisis individual de clones de fagos. A) Análisis de la unión por ELISA de fagos de 20 clones seleccionados al azar de la tercera ronda de tamizaje. El Rituximab, el fragmento Fc hulgG y el anticuerpo secundario ("ac 2rio") se usaron para evaluar la especificidad de los péptidos presentados en fagos. Fc HulgG: fragmento Fc de IgG humana (Merck Millipore). ac 2rio: anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado a HRP (Sigma). Se muestra la media de dos experimentos. Los valores de SD se representan como barras de error. B) Alineamiento de secuencia de los clones seleccionados que tienen un motivo 'YPG' común. El alineamiento de secuencia de todos los clones de unión a IMAB362 se representan como WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

35 Figura 2. Análisis SAR de los péptidos de unión a IMAB362 mediante el uso de microarreglos de péptidos. Se muestran los resultados para el análisis de sustitución de las secuencias número 1, 2 y 3. Cada aminoácido de la secuencia inicial (que se muestra en la parte inferior) se sustituye por cada uno de los otros aminoácidos naturales excepto Cys, lo que resulta en un número total de $7 \times 19 \times 3 = 399$ péptidos diferentes. El color oscuro representa señales fuertes, las sombras muestran señales más débiles. Los cuadros azules indican los aminoácidos de los péptidos originales. Los péptidos resaltados con los cuadros verdes se seleccionaron para la resíntesis, purificación y análisis de unión detallado.

45 Figura 3. ELISA de péptidos con y sin incubación con suero. A) Comparación del péptido mimótopo parental 2a con las correspondientes variantes maduradas 2b y 2c en la ausencia de suero. ac control: anticuerpo con un esqueleto quimerizado idéntico en comparación con IMAB362, dirigido contra una molécula de Claudina diferente. B) Análisis de unión de 2c a IMAB362 en la presencia de 0-20 % de suero murino. C) Análisis de unión de 2c a IMAB362 en la presencia de 0-20 % de suero humano. Los datos se ajustaron con Sigma Plot mediante el uso de un modelo de saturación de dos sitios.

50 Figura 4. Análisis farmacocinético de IMAB362 mediante el uso del ensayo establecido de ELISA de péptidos. El IMAB362, el Rituximab o el tampón PBS solo se inyectaron de manera intravenosa a ratones Balb/-cJ. Se tomaron muestras sanguíneas durante un período de 8 días consecutivos y se analizaron mediante ELISA de péptidos con el péptido mimótopo 2c para la captura de anticuerpo. Se muestra los valores de la mediana de dos ratones por punto de tiempo para cada grupo y la SD se presenta como barras de errores para cada punto de tiempo.

55 Figura 5. Interferometría de biocapa de la interacción del anticuerpo IMAB362 con los péptidos mimótopos (1a, 1c, 2a, 2c, 3a, 3c). Se cargaron biosensores de estreptavidina con 5 µg/ml del respectivo péptido biotinilado seguido por la incubación con diferentes concentraciones de IMAB362 (15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 nM). Se muestran las curvas de asociación y disociación después del procesamiento inicial (sustracción de la referencia, alineada a la línea base).

65 Figura 6. Efecto de los mimótopos en los efectos mediados por BiMAB.

(A) Se preincubó un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla específico para CD3 ϵ en células T y CLDN18.2 en células diana cancerosas con 20 μ g/ml del mimótopo de CLDN18.2 en complejo con Neutravidina en una relación molar de 1:8. Posteriormente, el complejo se incubó con células diana NugC4. En paralelo, BiMAB sin tratar se incubó con las células como control. La unión de BiMAB a las células respectivas se detectó por tinción con un anticuerpo anti-His y un anticuerpo secundario conjugado a alofococianina seguido por análisis FACS. Cada muestra se corrió en duplicados y la SD se muestra como barras de errores.

(B) Se evaluó la lisis de las células dianas NugC4 por un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla específico para CD3 ϵ en células T y CLDN18.2 en células diana cancerosas en un ensayo de citotoxicidad. Se preincubaron concentraciones diferentes del BiMAB con 20 μ g/ml del mimótopo de CLDN18.2 en complejo con Neutravidina en una relación molar de 1:8 antes de la incubación en presencia de células T humanas primarias y células diana NugC4 transfectadas con luciferasa durante 24 hrs. Posteriormente, se añadió luciferina a las células y se midió la luminiscencia en un lector de placa. Para calcular la lisis específica, se usó la lisis mínima (células NugC4 y células T) y la máxima (células NugC4 y células T después de la adición de Triton-X-100 en una concentración final del 2 %). Como un control se realizó el mismo ensayo sin la adición del complejo del mimótopo. Los datos muestran los valores medios de triplicados con la correspondiente SD mostrada por barras de errores.

Descripción detallada

Aunque la presente enseñanza se describe en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares que se describen en la presente descripción, ya que estos pueden variar. Debe entenderse, también, que la terminología utilizada en la presente descripción es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente 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, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos descritos de diversas maneras y las modalidades preferidas no deben interpretarse para limitar la presente invención a solamente las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción sustenta y abarca modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier cantidad de elementos descritos y/o preferidos. Además, cualquiera de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse descritas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera.

Preferentemente, los términos que se usan en la presente descripción se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza, (1995).

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura del campo (consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición, J. Sambrook y otros eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de cualquier otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas aunque en algunas modalidades se pueden excluir este otro miembro, entero, o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro, entero o etapa declarada o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado de referir individualmente cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si estos se enumeraran individualmente en la presente descripción. Todos los métodos descritos en la presente descripción pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente de cualquier otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en la presente descripción, sólo tiene la intención de ilustrar mejor la enseñanza y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de cualquier otra manera. De ninguna manera el lenguaje en la descripción se deberá interpretar como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica la invención.

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 transmembranas que se extienden por la membrana 4 veces con el extremo N-terminal y el extremo C-terminal, ambos localizados en el citoplasma. El primer lazo extracelular, denominado EC1 o ECL1, consiste en promedio de 53 aminoácidos, y el segundo lazo extracelular, denominado EC2 o ECL2, consiste en alrededor de 24 aminoácidos. Las proteínas de la superficie celular de la familia de claudina, tal como CLDN18.2, se expresan en tumores de diferentes orígenes, y son particularmente adecuados como estructuras diana en relación con la inmunoterapia del cáncer mediada por anticuerpos debido a su expresión selectiva (sin expresión en un tejido normal relevante de toxicidad) y localización en la membrana plasmática.

El término "CLDN" como se usa en la presente descripción significa claudina e incluye CLDN18.2. Preferentemente, una claudina es una claudina humana.

El término "CLDN18" se refiere a la claudina 18 e incluye cualquiera de las variantes, que incluye la variante 1 de corte y empalme de claudina 18 (claudina 18.1 (CLDN18.1)) y la variante 2 de corte y empalme de claudina 18 (claudina 18.2 (CLDN18.2)).

El término "CLDN18.2" preferentemente se refiere a CLDN18.2 humana, y, en particular, a una proteína que comprende, preferentemente que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos. El primer lazo extracelular de CLDN18.2 comprende, preferentemente, los aminoácidos 27 al 81, con mayor preferencia los aminoácidos 29 al 78 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1. El segundo lazo extracelular de CLDN18.2 comprende, preferentemente, los aminoácidos 140 al 180 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1. Dicho primer y segundo lazos extracelulares forman, preferentemente, la porción extracelular de 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 diferentes orígenes tales como carcinoma pancreático, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico, carcinoma bronquial, carcinoma de mama y tumores ENT. CLDN18.2 es una diana valiosa para la prevención y/o tratamiento de tumores primarios, tales como cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, y cánceres de la vesícula biliar, y sus metástasis, en particular, metástasis de cáncer gástrico tales como tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y metástasis de ganglios linfáticos.

El término "variante" de acuerdo con la invención se refiere, en particular, a mutantes, variantes de corte y empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están presentes de manera natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa identifica a menudo numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. El término "variante" abarcará cualquiera de las variantes modificadas postraduccionalmente y variantes conformacionales.

De acuerdo con la invención, el término "cáncer positivo a claudina" o términos similares significan un cáncer que involucra células cancerosas que expresan una claudina, preferentemente en la superficie de dichas células cancerosas.

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

Una claudina se expresa en la superficie de las células si se localiza en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por los anticuerpos específicos de claudina adicionados a la célula.

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 de cara al espacio extracelular de una célula y preferentemente es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por moléculas de unión a antígeno tales como anticuerpos localizados en el exterior de la célula. Preferentemente, el término se refiere a uno o más lazos extracelulares o dominios o un fragmento de estos.

Los términos "parte" o "fragmento" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un elemento continuo. Por ejemplo, una parte de una estructura tal como una secuencia de aminoácidos o proteína se refiere a un elemento continuo de dicha estructura. Una porción, una parte o un fragmento de una estructura, preferentemente, comprende una o más propiedades funcionales de dicha estructura. Por ejemplo, una porción, una parte o un fragmento de un epítipo o péptido es, preferentemente, equivalente inmunológicamente al epítipo o péptido del que se deriva. Una parte o fragmento de una secuencia de proteína comprende, preferentemente, una secuencia de al menos 6, en particular 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 proteína.

De acuerdo con la enseñanza, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión es menor en comparación con la expresión en las células estomacales o tejido estomacal. Preferentemente, el nivel de expresión es inferior al 10 %, preferentemente, inferior al 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,05 % de la expresión en las células estomacales o tejido estomacal o incluso inferior. Preferentemente, CLDN18.2 no se expresa sustancialmente en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en el tejido no cancerígeno distinto al tejido estomacal en no más de 2 veces, preferentemente, 1,5 veces, y preferentemente, no excede el nivel de expresión en dicho tejido no cancerígeno. Preferentemente, 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 con los anticuerpos específicos a CLDN18.2 añadidos a las células.

De acuerdo con la enseñanza, CLDN18.2 se expresa en una célula si el nivel de expresión excede el nivel de expresión en el tejido no canceroso distinto del tejido estomacal, preferentemente en más de 2 veces, preferentemente 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces. Preferentemente, 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 suficientemente alto para permitir la unión con los anticuerpos específicos a CLDN18.2 añadidos a las células. Preferentemente, CLDN18.2 se expresa en una célula si se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

De acuerdo con la presente invención el término "mimótopo" se refiere a una molécula que es un mimético de un epítipo. El mimótopo puede también actuar como un competidor para el epítipo del cual es un mimético en ensayos in vitro (por ejemplo, ensayos de ELISA) y preferentemente unirse a la misma región de unión a antígeno de un anticuerpo el cual se une inmunoespecíficamente a un epítipo de un antígeno deseado. El mimótopo puede generar una respuesta inmunológica en un huésped que es reactivo al antígeno del cual es un mimético.

De acuerdo con la enseñanza, los mimótopos peptídicos pueden producirse de manera sintética mediante métodos de síntesis química los cuales se conocen bien en la técnica, tanto como un péptido aislado o como una parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, un mimótopo peptídico puede producirse en un microorganismo que produce el mimótopo peptídico que después se aísla y si se desea, además se purifica. Por lo tanto, el mimótopo peptídico puede producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras, u hongos; en células eucariotas tales como células de mamífero o insecto; o, en un vector de virus recombinante tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus del bosque Simliki, baculovirus, bacteriófago, virus sindbis, o virus sendai. Las bacterias adecuadas para producir el mimótopo peptídico incluyen Escherichia coli, Bacillus subtilis, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar péptidos tales como el mimótopo peptídico. Los tipos de levadura adecuadas para expresar el mimótopo peptídico incluyen, pero no se limitan a Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida, o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los métodos para el uso de las bacterias, vectores virales recombinantes, células eucariotas, para producir péptidos se conocen bien en la técnica.

Para producir el mimótopo peptídico, el ácido nucleico que codifica el mimótopo peptídico está preferentemente en un plásmido y el ácido nucleico se une operativamente a un promotor que efectúa la expresión del mimótopo peptídico en un microorganismo. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, promotor del fago T7, promotor del fago T3, promotor de la β -galactosidasa, y el promotor del fago Sp6. Los métodos para aislar y purificar péptidos se conocen bien en la técnica e incluyen métodos tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, o centrifugación.

Los mimótopos peptídicos, tanto por sí solos o como parte de un péptido de fusión, pueden conjugarse a un péptido o proteína heteróloga. Tales proteínas heterólogas incluyen, pero no se limitan a, proteínas portadoras tales como albúmina de suero bovino (BSA), y enzimas reporteras que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Además, los mimótopos peptídicos o péptidos de fusión que comprenden el mimótopo peptídico pueden conjugarse químicamente a moléculas reporteras fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína o R-ficoeritrina. Los métodos para conjugar proteínas portadoras, enzimas, y moléculas reporteras fluorescentes a péptidos y péptidos de fusión se conocen bien en la técnica.

Para facilitar el aislamiento del mimótopo peptídico, puede hacerse un polipéptido de fusión en donde el mimótopo peptídico se fusiona traduccionalmente (se une covalentemente) a una cola heteróloga tal como un polipéptido heterólogo o polihistidina, preferentemente seis residuos de histidina, lo que permite la recuperación simplificada del polipéptido de fusión, por ejemplo, su aislamiento por cromatografía de afinidad o cromatografía de afinidad a metal, preferentemente cromatografía de afinidad a níquel. En algunos casos puede ser conveniente eliminar la cola después de la purificación. Por lo tanto, también se contempla que el polipéptido de fusión comprende un sitio de corte en la unión entre el mimótopo peptídico y la cola heteróloga. El sitio de corte consiste en una secuencia de aminoácidos que se corta con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio.

Los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción pueden usarse como un control o competidor en los inmunoensayos para detectar CLDN18.2 y pueden usarse para detectar las moléculas de unión a CLDN18.2 tales como anticuerpos CLDN18.2. Los mimótopos peptídicos pueden además usarse en terapias para tratar animales o humanos expuestos a moléculas de unión a CLDN18.2 tales como anticuerpos CLDN18.2 terapéuticos, por ejemplo, para modular, en particular reducir, la actividad de la molécula de unión a CLDN18.2.

Por ejemplo, los mimótopos peptídicos, tanto solos, o como un componente de un polipéptido de fusión, tal como conjugado a una proteína portadora o molécula reportera fluorescente, son útiles como estándar y conjugados en inmunoensayos como ELISA y RIAs, que se usan para determinar si una muestra contiene CLDN18.2. En tales inmunoensayos, el uso de CLDN18.2 como un control o como un competidor se ha dificultado. Por lo tanto, los mimótopos peptídicos proporcionan una ventaja significativa sobre CLDN18.2.

En general, los inmunoensayos se realizan mediante el uso de una modalidad del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se puede proporcionar una placa microtituladora que contiene una pluralidad de pocillos en donde un primer pocillo o serie de pocillos contiene un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2 inmovilizado a la superficie de este. Una muestra puede mezclarse con el mimótopo peptídico y la mezcla añadirse a los pocillos que contienen el anticuerpo monoclonal unido. El mimótopo péptido puede ser parte de un polipéptido de fusión. La CLDN18.2 en la muestra y el mimótopo peptídico compiten por unirse al anticuerpo monoclonal. El ELISA se incuba durante un tiempo suficiente para que se formen los complejos con el anticuerpo. Después, los pocillos se lavan para eliminar cualquier material no unido. Después, los pocillos pueden incubarse con un anticuerpo marcado o un anticuerpo conjugado a una molécula reportera que se une al polipéptido de fusión para formar un complejo que puede detectarse. Una señal detectable del reportero puede indicar que la muestra no contiene CLDN18.2 mientras que una ausencia de una señal puede indicar que la muestra contiene CLDN18.2 que se unió a todo el anticuerpo monoclonal, lo que evita de esta manera que el mimótopo peptídico se una al anticuerpo monoclonal inmovilizado en los pocillos. Cuando el polipéptido de fusión comprende una etiqueta o molécula reportera tal como una enzima reportera tal como fosfatasa alcalina, el complejo peptídico mimótopo- anticuerpo puede detectarse directamente sin la necesidad de un anticuerpo marcado.

Alternativamente, se puede proporcionar una placa microtituladora que contiene una pluralidad de pocillos en donde un primer pocillo o serie de pocillos contiene el mimótopo peptídico, que puede conjugarse a una proteína portadora o polipéptido de fusión, inmovilizado a la superficie de estos. La muestra puede añadirse a los pocillos que contienen los mimótopos peptídicos unidos junto con una cantidad constante de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2. La CLDN18.2 en la muestra y el mimótopo peptídico unido a las superficies de los pocillos compiten por unirse al anticuerpo monoclonal. El ELISA se incuba durante un tiempo suficiente para que se formen los complejos con el anticuerpo. Después, los pocillos se lavan para eliminar cualquier material no unido. La cantidad de anticuerpo monoclonal que se une a los péptidos mimótopos inmovilizados en el pocillo se determina mediante la incubación de los pocillos con un anticuerpo marcado o un anticuerpo conjugado a una molécula reportera que se une al anticuerpo contra CLDN18.2 para formar un complejo que puede detectarse. Una señal detectable del reportero indica que la muestra no contiene CLDN18.2 mientras que una ausencia de una señal indica que la muestra contiene CLDN18.2 que se unió a todo el anticuerpo contra CLDN18.2, lo que evita de esta manera que el anticuerpo se una al mimótopo peptídico inmovilizado en los pocillos. La intensidad de la señal proporciona un estimado de la concentración relativa de CLDN 18.2 en la muestra. Alternativamente, el anticuerpo contra CLDN18.2 puede marcarse con un reportero en cuyo caso el anticuerpo unido puede detectarse sin la necesidad de un anticuerpo marcado. En este caso, la detección es mediante métodos que se conocen bien en la técnica para detectar el ligando reportero particular.

En lugar de una ELISA, los mimótopos peptídicos pueden usarse en un radioinmunoensayo (RIA) para detectar CLDN18.2 en una muestra. El procedimiento del RIA puede involucrar la incubación de un anticuerpo monoclonal contra CLDN18.2, simultáneamente con una solución de muestra desconocida o estándar conocido y una cantidad constante de mimótopo peptídico o polipéptido de fusión marcado radiactivamente. Después de la separación del mimótopo peptídico o polipéptido de fusión libre del mimótopo peptídico o polipéptido de fusión unido, se determina la radiactividad en las respectivas fracciones. La concentración de CLDN18.2 en la muestra desconocida se determina mediante la comparación de los resultados con una curva estándar. Varios métodos conocidos pueden usarse para la separación del mimótopo peptídico o polipéptido de fusión libre del unido en el RIA. La radiactividad puede determinarse en un contador de centelleo líquido.

De acuerdo con la enseñanza, la CLDN18.2 que se va a ensayar puede expresarse en la superficie de una célula.

Los mimótopos de la enseñanza pueden usarse también en métodos para detectar la presencia de anticuerpos contra CLDN18.2. El diseño de inmunoensayos adecuados para poner en práctica estos métodos puede estar sujeto a mucha variación y una variedad de estos inmunoensayos se conocen en la técnica. Los protocolos adecuados de inmunoensayos pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de competencia, o reacción directa, o tipo sándwich. Los protocolos de inmunoensayos que se usan pueden también, por ejemplo, usar soportes sólidos, o pueden ser por inmunoprecipitación. Los ensayos pueden involucrar el uso de anticuerpos marcados y las etiquetas pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, o moléculas colorantes. Los ensayos particulares preferidos son los inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tal como los ensayos ELISA.

En consecuencia, los mimótopos peptídicos pueden usarse también en un ensayo tal como un ensayo ELISA para determinar el anticuerpo contra CLDN18.2 en una muestra. Para este propósito, los pocillos de las placas de ELISA pueden cubrirse con los mimótopos peptídicos. Posteriormente, puede añadirse una muestra tal como plasma y puede realizarse la detección de los anticuerpos específicos de péptidos (anticuerpo primario) con un anticuerpo secundario marcado dirigido contra el anticuerpo primario.

Los mimótopos de la enseñanza pueden unirse a un soporte sólido, por ejemplo, la superficie de un pocillo o tira reactiva de inmunoensayo, y/o empacarse en kits en un contenedor adecuado junto con reactivos, controles, instrucciones adecuadas y similares.

- 5 En consecuencia la presente enseñanza también proporciona un kit que comprende al menos un mimótopo de la presente enseñanza. En una modalidad preferida, el kit además comprende al menos un agente adicional tal como uno o más reactivos adecuados para realizar un inmunoensayo, un control, o instrucciones para el uso del kit.

10 Cuando se usa como un reactivo de ensayo como se describe en la presente descripción, un mimótopo de la enseñanza puede conjugarse a una etiqueta. Preferentemente, la etiqueta es cualquier entidad cuya presencia puede detectarse fácilmente. Preferentemente la etiqueta es una etiqueta directa. Las etiquetas directas son entidades que, en su estado natural, son visibles fácilmente tanto a simple vista, o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, por ejemplo, luz UV para generar fluorescencia. Los ejemplos incluyen compuestos radiactivos, quimioluminiscentes, electroactivos (tales como etiquetas redox), y fluorescentes. Las etiquetas de partículas directas, tales como soles de colorantes, soles metálicos (por ejemplo, oro) y partículas de látex coloreadas, son también muy adecuadas y junto con los compuestos fluorescentes son las preferidas. De estas opciones, las partículas de látex coloreadas y los compuestos fluorescentes son los de mayor preferencia. La concentración de la etiqueta en una zona o volumen pequeño debe originar una señal fácilmente detectable, por ejemplo, un área coloreada fuertemente. Las etiquetas indirectas, tales como enzimas, por ejemplo, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano, pueden usarse también, aunque estas requieren usualmente la adición de uno o más reactivos reveladores tales como los sustratos antes que pueda detectarse una señal visible.

25 La conjugación de la etiqueta al mimótopo de la enseñanza puede ser mediante enlace covalente o no covalente (incluyendo hidrofóbico), o por adsorción. Las técnicas para tal conjugación son comunes en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para los reactivos particulares que se emplean.

De acuerdo con la enseñanza se proporciona además un dispositivo de ensayo que comprende al menos un mimótopo de la presente enseñanza. En una modalidad, el dispositivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

30 Tal dispositivo puede tomar diferentes formas, y puede variar en dependencia de la naturaleza precisa del ensayo que se realiza. Por ejemplo, el mimótopo de la enseñanza puede cubrirse en un soporte sólido, típicamente de nitrocelulosa u otro material poroso hidrofóbico. Alternativamente, el mimótopo puede cubrirse sobre un material plástico sintético, una placa de ensayo microtituladora, un chip de microarreglo, una perla de látex, un filtro que comprende un material polimérico sintético o celulósico, un portaobjetos de vidrio o plástico, una tira reactiva, un dispositivo de llenado por capilaridad y similares. El recubrimiento de los mimótopos a estas superficies puede lograrse mediante métodos que se conocen en la técnica. Los portadores proteicos se usan típicamente para formar complejos, con BSA o péptidos adhesivos que son los más preferidos. En una modalidad, el mimótopo de la enseñanza se inmoviliza de manera liberable en el soporte sólido. En una modalidad preferida adicional, el reactivo diagnóstico se inmoviliza de manera no liberable en el soporte sólido.

45 Los mimótopos de la enseñanza pueden además usarse como vacunas para inducir anticuerpos CLDN18.2 o para modular la actividad de agentes de unión a CLDN18.2 tales como anticuerpos CLDN18.2, en particular anticuerpos biespecíficos que se unen a CLDN18.2. Con en este fin, los mimótopos de la enseñanza pueden combinarse con varios componentes para producir composiciones aceptables farmacéuticamente.

50 El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica que se asocia con signos y síntomas específicos. Una enfermedad puede ser causada por factores originalmente de una fuente externa, tal como enfermedad infecciosa, o puede ser causada por disfunciones internas, tal como enfermedades autoinmunes. En humanos, "enfermedad" se usa a menudo más ampliamente para referirse a cualquier afección que causa dolor, disfunción, sufrimiento, problemas sociales, o la muerte al individuo afectado, o problemas similares para aquellos en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, algunas veces incluye heridas, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, comportamientos anormales, y variaciones atípicas de la estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros propósitos estas pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades usualmente afectan a los individuos no solo físicamente, si no también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de uno de la vida y la personalidad de uno. De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" incluye cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas en la presente descripción. Cualquier referencia en la presente descripción a cáncer o formas particulares de cáncer también incluye la metástasis del cáncer de las mismas. En una modalidad preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud involucra células que expresan CLDN18.2.

65 Las "enfermedades que involucran células que expresan CLDN18.2" o expresiones similares significa de acuerdo con la invención que CLDN18.2 se expresa en las células de un tejido u órgano enfermo. En una modalidad, la expresión de CLDN18.2 en células de un tejido u órgano enfermo aumenta 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 aún más. En una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la enseñanza, las enfermedades que involucran células que expresan CLDN18.2 incluyen enfermedades cancerígenas. Además, de acuerdo con la enseñanza, preferentemente las enfermedades cancerígenas son aquellas en donde las células cancerosas expresan CLDN18.2.

Los términos "enfermedad cancerígena" o "cáncer" se refieren a o describen el estado fisiológico en un individuo que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, los ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer óseo, cáncer sanguíneo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del útero, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, Enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de los riñones, carcinoma celular renal, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodermal, tumores del eje espinal, glioma, meningioma, y adenoma pituitario. El término "cáncer" de acuerdo con la invención también comprende, las metástasis del cáncer. Preferentemente, una "enfermedad cancerígena" se caracteriza por las células que expresan CLDN18.2 y una célula cancerosa expresa CLDN18.2. Una célula que expresa CLDN18.2 preferentemente es una célula cancerosa, preferentemente de los cánceres que se describen en la presente descripción.

Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de las células malignas del tumor primario, invasión de la matriz extracelular, penetración de las membranas basales del endotelio para entrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haber sido transportadas por la sangre, la infiltración en los órganos dianas. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el lugar diana depende de la angiogénesis. Frecuentemente, la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario ya que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la invención se refiere a la metástasis de ganglios linfáticos. Una forma particular de metástasis que es tratable mediante el uso de la terapia de la invención es la metástasis que se origina de cáncer gástrico como sitio primario. En modalidades preferidas tal metástasis de cáncer gástrico son tumores de Krukenberg, metástasis peritoneal y/o metástasis de ganglios linfáticos.

El tumor de Krukenberg es un tumor metastásico infrecuente del ovario que representa del 1 % al 2 % de todos los tumores ováricos. El pronóstico del tumor de Krukenberg es todavía muy pobre y no hay tratamiento establecido para los tumores de Krukenberg. El tumor de Krukenberg es un adenocarcinoma del ovario metastásico de las células en forma de anillo de sello. El estómago es el sitio primario en la mayoría de los casos del tumor de Krukenberg (70 %). Los carcinomas de colon, apéndice, y mama (principalmente el carcinoma lobular invasivo) son los sitios primarios siguientes más comunes. Se han reportado casos raros del tumor de Krukenberg que se originan de carcinomas de la vesícula biliar, el tracto biliar, el páncreas, el intestino delgado, la ampolla de Vater, la cerviz, y la vejiga urinaria/uraco.

El término "tratamiento" o "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejora el estado de salud y/o prolonga (aumenta) la esperanza de vida de un individuo. Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o enlentecer el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o enlentecer el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo, y/o disminuir la recurrencia en un individuo quien actualmente tiene o quien previamente tuvo una enfermedad.

Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se refieren a cualquier tratamiento que pretende prevenir la aparición de una enfermedad en un individuo. Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se usan en la presente descripción indistintamente.

Los términos "inmunización" o "vacunación" describen el proceso de administrar un antígeno a un individuo con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria, por ejemplo, por razones terapéuticas o profilácticas.

Los términos "proteger", "prevenir", "profiláctico", "preventivo" o "protector" se refieren a la prevención y/o al tratamiento de la ocurrencia y/o la propagación de una enfermedad, por ejemplo, un tumor, en un individuo. Por ejemplo, una administración profiláctica de una terapia puede proteger al individuo que la recibe del desarrollo de una enfermedad.

Los términos "individuo" y "sujeto" se usan indistintamente en la presente descripción. Se refieren a seres humanos, primates no humanos u otros mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, porcino, oveja, caballo o primate) que pueden ser afectados con o son susceptibles a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero

pueden o no pueden tener la enfermedad o el trastorno. En muchas modalidades, el individuo es un ser humano. A menos que se indique de cualquier otra manera, los términos "individuo" y "sujeto" no indican una edad particular, y por tanto abarcan adultos, ancianos, niños, y recién nacidos. En modalidades preferidas de la presente invención, el "individuo" o "sujeto" es un "paciente". El término "paciente" significa de acuerdo con la invención un sujeto para el tratamiento, en particular un sujeto enfermo.

"Célula diana" significará cualquier célula no deseada tal como una célula cancerosa. En modalidades preferidas, la célula diana expresa CLDN18.2.

El término "antígeno" se refiere a un agente que comprende un epítipo contra el cual se genera y/o se direcciona una respuesta inmunitaria. El término "antígeno" incluye en particular proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, especialmente ARN y ADN, y nucleótidos. El término "antígeno" también incluye agentes, que se convierten en antigénicos - y sensibilizantes - solo a través de la transformación (por ejemplo, de manera intermedia en la molécula o por terminación con la proteína del cuerpo). Un antígeno o un producto procesado de este se reconoce preferentemente por un receptor de células T o B, o por una molécula de inmunoglobulina tal como un anticuerpo. En una modalidad preferida, el antígeno es un antígeno asociado a enfermedad, tal como un antígeno tumoral, un antígeno viral, o un antígeno bacteriano.

En el contexto de la presente invención, el término "antígeno tumoral" o "antígeno asociado a tumor" preferentemente se refiere a proteínas que bajo condiciones normales se expresan específicamente en un número limitado de tejidos y/o órganos o en etapas específicas del desarrollo y se expresan o se expresan de manera aberrante en uno o más tumores o tejidos cancerosos. En el contexto de la presente invención, el antígeno asociado a tumor se asocia preferentemente con la superficie celular de una célula cancerosa y preferentemente no se expresa o solo se expresa rara vez en tejidos normales. Por ejemplo, CLDN18.2 se ha identificado como expresada diferencialmente en tejidos tumorales, los únicos tejidos normales que expresan CLDN18.2 son los del estómago

El término "epítipo" se refiere a un determinante antigénico en una molécula, es decir, a la parte en una molécula que se reconoce por el sistema inmune, por ejemplo, que se reconoce por un anticuerpo. Por ejemplo, los epítopos son los sitios discretos, tridimensionales en un antígeno, que se reconocen por el sistema inmune. Los epítopos usualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen, usualmente características específicas de estructura tridimensional, así como también características específicas de carga. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. Un epítipo de una proteína comprende, preferentemente, una porción continua o discontinua de dicha proteína y tiene, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente, entre 5 y 50, con mayor preferencia entre 8 y 30, con la máxima preferencia entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítipo puede tener, preferentemente, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con la invención, el término "agente de unión a CLDN18.2" incluye cualquier compuesto que tiene una capacidad de unión a CLDN18.2. Preferentemente, tal agente de unión comprende al menos un dominio de unión para CLDN18.2. El término incluye moléculas tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas y receptores de antígeno quiméricos (CARs). El término también incluye todas las moléculas de unión artificiales (andamiaje) que tienen una capacidad de unión a CLDN18.2 que incluye, pero no se limitan a nanocuerpos, afucuerpos, anticalinas, DARPins, monocuerpos, avímeros, y microcuerpos. En una modalidad dicho agente de unión se une a un dominio extracelular de CLDN18.2. En una modalidad dicho agente de unión se une a los epítopos nativos de CLDN18.2 presente en la superficie de las células vivas. En una modalidad dicho agente de unión se une al primer lazo extracelular de CLDN. En una modalidad dicha unión a CLDN18.2 es una unión específica.

En una modalidad el dominio de unión que se une a CLDN18.2 comprende un dominio variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (VH) con una especificidad para un antígeno de claudina 18.2 (VH(CLDN18.2)) y un dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (VL) con una especificidad para un antígeno de claudina 18.2 (VL(CLDN18.2)).

En una modalidad dicho VH(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 2 o un fragmento de esta o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento y la VL(CLDN18.2) comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 3 o un fragmento de esta o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o fragmento.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. Cada cadena pesada se comprende por una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera se comprende por una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco

(FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y al primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionada a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente descripción, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de estos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria, recombinante de anticuerpos y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre el corte y empalme de secuencias génicas de la inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva esencialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en donde la estructura de la inmunoglobulina remanente de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender tanto dominios variables completos fusionados a dominios constantes como solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en las regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser silvestres o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos 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 que se alteran con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en donde una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase particular, mientras que el segmento remanente de la cadena es homólogo a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada mimetiza las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas mediante el uso de células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos huéspedes no humanos en combinación con las regiones constantes que se derivan de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar y la fuente no afecta a la especificidad, la región constante que es humana, es menos probable que genere una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Los anticuerpos pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobayo y humano.

Los anticuerpos que se describen en la presente descripción incluyen IgA tal como anticuerpos IgA1 o IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, e IgD. En varias modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un anticuerpo IgG1, isotipo kappa o IgG1, isotipo lambda (es decir, IgG1, κ , λ), un anticuerpo IgG2a (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).

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante que corresponde a la encontrada en un organismo que no es el organismo transgénico, y que generalmente se deriva de una especie distinta a la del organismo transgénico.

Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras 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.

5 Los anticuerpos que se describen en la presente descripción son, preferentemente, aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLDN18.2, está esencialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CLDN18.2). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLDN18.2 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de CLDN18.2). Además, un anticuerpo aislado puede estar esencialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a los anticuerpos que tienen especificidades diferentes y que se combinan en una composición bien definida o mezcla.

15 Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión") o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "fragmento de unión") o términos similares, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de 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 Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones aisladas determinantes de la complementariedad (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, pueden unirse, mediante el uso de métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite hacerlos como una cadena sencilla de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); ver por ejemplo, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que dichos anticuerpos de cadena sencilla se abarquen dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que se fusiona a un polipéptido de la región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante CH₂ de la cadena pesada de la inmunoglobulina que se fusiona a la región bisagra y (iii) una región constante CH₃ de la cadena pesada de la inmunoglobulina fusionada a la región constante CH₂. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen además en los documentos núms. US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la técnica, y los fragmentos se tamizan por la utilidad en la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente invención una estructura, por ejemplo, de un anticuerpo, que se une a/interactúa con una determinada estructura/antígeno/epítipo diana. Por lo tanto, el dominio de unión de acuerdo con la invención designa un "sitio de interacción con el antígeno".

45 Todos los anticuerpos y derivados de anticuerpos como fragmentos de anticuerpos como se describe en la presente descripción, para los fines de la invención, se abarcan por el término "anticuerpo". 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 como se describe en la presente descripción son útiles para producir agentes de unión de la invención tales como fragmentos de anticuerpos.

Los anticuerpos presentes de manera natural son generalmente mono-específicos, es decir, se unen a un único antígeno. La presente invención también prevé agentes de unión que son moléculas biespecíficas o multiespecíficas que se unen a CLDN18.2 y a uno o más antígenos adicionales. Los agentes de unión particularmente preferidos son los que se unen a una célula citotóxica (por ejemplo, por unión al receptor de CD3) y a una célula cancerosa (por unión a CLDN18.2). Tales agentes de unión son al menos biespecíficos o multiespecíficos tal como trispecífico, tetraespecífico y así sucesivamente.

60 Por lo tanto, en una modalidad, un agente de unión de acuerdo con la enseñanza comprende al menos dos dominios de unión, en donde un primer dominio de unión se une a CLDN18.2 y un segundo dominio de unión se une a CD3. Tal agente de unión puede unirse a una célula citotóxica (por ejemplo, por unión al receptor de CD3) y a una célula cancerosa que expresa CLDN18.2 para ser destruida como una diana.

65 Los agentes de unión biespecíficos o multiespecíficos pueden estar en el formato de una molécula de anticuerpo o de una molécula parecida a anticuerpo o de una proteína de andamiaje con propiedades similares a anticuerpo o de un

péptido cíclico con al menos dos especificidades de unión. Por lo tanto, el agente de unión puede comprender uno o más anticuerpos como se describe en la presente descripción o fragmentos de estos.

De acuerdo con la enseñanza, una molécula biespecífica, en particular una proteína biespecífica, tal como un anticuerpo biespecífico es una molécula que tiene dos especificidades de unión diferentes y por lo tanto puede unirse a dos tipos diferentes de antígeno tales como CLDN18.2 y CD3. Particularmente, el término "anticuerpo biespecífico" como se usa en la presente descripción se refiere a un anticuerpo que comprende dos sitios de unión a antígeno, un primer sitio de unión que tiene afinidad por un primer antígeno o epítipo y un segundo sitio de unión que tiene afinidad de unión por un segundo antígeno o epítipo distinto del primero. En particular, un anticuerpo biespecífico es una proteína artificial que se compone de fragmentos de dos anticuerpos diferentes (dichos fragmentos de dos anticuerpos diferentes forman dos dominios de unión) y consecuentemente se une a dos tipos diferentes de antígeno. Un anticuerpo biespecífico preferentemente se ingenieriza para que una simultáneamente una célula inmunitaria, tal como una célula efectora inmunitaria, en particular una célula T como una célula citotóxica (por ejemplo, por unión a CD3) y una célula diana como una célula cancerosa (por unión al antígeno CLDN18.2 asociado a el tumor) para ser destruida.

El término "anticuerpo biespecífico" incluye, también diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los cuales los dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica única, pero mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, de esta manera obliga a que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno (ver por ejemplo, Holliger, P., y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448; Poljak, R. J., y otros, 1994, Structure 2:1121-1123).

Los "agentes de unión multiespecíficos" son moléculas que tienen más de dos especificidades de unión diferentes.

De acuerdo con la enseñanza se prefieren particularmente los anticuerpos biespecíficos que incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos, en particular anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos que incluyen fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos. El término "anticuerpo de cadena sencilla biespecífico" indica una cadena de polipéptidos sencilla que comprende dos dominios de unión. En particular, el término "anticuerpo de cadena sencilla biespecífico" o "anticuerpo biespecífico de cadena sencilla" o términos relacionados de acuerdo con la presente enseñanza preferentemente significa construcciones de anticuerpo que resultan de la unión de al menos dos regiones variables de anticuerpo en una cadena de polipéptidos sencilla sin la porción(ones) constante(s) y/o Fc presentes en las inmunoglobulinas completas.

Por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico puede ser una construcción con un total de dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, dos regiones VH, cada una capaz de unirse específicamente a un antígeno separado, y conectadas entre sí a través de un espaciador corto de polipéptidos de manera que las dos regiones variables de anticuerpo con su espaciador interpuesto existen como una cadena sencilla continua de polipéptidos. Otro ejemplo de un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico puede ser una cadena sencilla de polipéptidos con tres regiones variables de anticuerpo. Aquí, dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una VH y una VL, pueden formar un scFv, en donde las dos regiones variables de anticuerpo se conectan entre sí a través de un conector sintético de polipéptidos, este último a menudo se ingenieriza genéticamente para que sea mínimamente inmunogénico mientras que conserva máximamente la resistencia a la proteólisis. Este scFv es capaz de unirse específicamente a un antígeno particular, y se conecta a una región variable de anticuerpo adicional, por ejemplo, una región VH, capaz de unirse a un antígeno diferente que aquel unido por el scFv. Todavía otro ejemplo de un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico puede ser una cadena sencilla de polipéptidos con cuatro regiones variables de anticuerpo. Aquí, las primeras dos regiones variables de anticuerpo, por ejemplo, una región VH y una región VL, pueden formar un scFv capaz de unirse a un antígeno, mientras que la segunda región VH y región VL pueden formar un segundo scFv capaz de unirse a otro antígeno. Dentro de una cadena sencilla continua de polipéptidos, las regiones individuales variables de anticuerpo de una especificidad pueden ventajosamente separarse por un conector sintético de polipéptidos, mientras que los respectivos scFv pueden ventajosamente separarse por un espaciador corto de polipéptidos como se describió anteriormente.

De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el primer dominio de unión del anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable del anticuerpo, preferentemente un dominio VHH. De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el primer dominio de unión del anticuerpo biespecífico comprende dos dominios variables del anticuerpo, preferentemente un scFv, es decir, VH-VL o VL-VH. De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el segundo dominio de unión del anticuerpo biespecífico comprende un dominio variable del anticuerpo, preferentemente un dominio VHH. De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el segundo dominio de unión del anticuerpo biespecífico comprende dos dominios variables del anticuerpo, preferentemente un scFv, es decir, VH-VL o VL-VH. En su forma mínima, el número total de regiones variables de anticuerpo en el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la enseñanza es por tanto sólo dos. Por ejemplo, tal un anticuerpo pudiera comprender dos dominios VH o dos VHH.

De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión del anticuerpo biespecífico cada uno comprende un dominio variable del anticuerpo, preferentemente un dominio VHH. De acuerdo con una modalidad de la enseñanza, el primer dominio de unión y el segundo dominio de unión del anticuerpo biespecífico cada uno comprende dos dominios variables del anticuerpo, preferentemente un scFv, es decir,

VH-VL o VL-VH. En esta modalidad, el agente de unión de la enseñanza preferentemente comprende (i) un dominio variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo CLDN18.2, (ii) un dominio variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo CLDN18.2, (iii) un dominio variable de la cadena pesada (VH) de un anticuerpo a un segundo antígeno, por ejemplo, de un anticuerpo CD3 y (iv) un dominio variable de la cadena ligera (VL) de un anticuerpo a un segundo antígeno, por ejemplo, de un anticuerpo CD3.

Los anticuerpos biespecíficos de longitud completa pueden obtenerse por la unión covalente de dos anticuerpos monoclonales o técnicas convencionales de hibridoma híbrido. La unión covalente de dos anticuerpos monoclonales se describe en Anderson, Blood 80 (1992), 2826-34. En el contexto de esta enseñanza, uno de los anticuerpos puede ser específico para CLDN18.2 y el otro para CD3.

En una modalidad, el agente de unión biespecífico está en el formato de una molécula parecida a anticuerpo con una cadena pesada que contiene dos dominios variables consecutivos N-terminales con especificidades diferentes y una cadena ligera con dos dominios variables consecutivos con especificidades diferentes lo que resulta en cuatro dominios de unión con dos especificidades diferentes (Wu y otros, Nat. Biotechnology, 2007, 25(11)), en donde una especificidad puede ser CD3 y la otra especificidad es CLDN18.2.

En una modalidad preferida, el agente de unión biespecífico de la enseñanza está en el formato de un fragmento de anticuerpo.

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de acuerdo con la enseñanza comprenden dos regiones Fab, por ejemplo, una que se dirige contra CLDN18.2 y la otra que se dirige contra CD3. En una modalidad, la molécula de la enseñanza es un complejo (Fab)₂ de fragmento de unión a antígeno. El complejo Fab₂ se compone de dos fragmentos Fab, un fragmento Fab que comprende un dominio Fv, es decir, dominios VH y VL, por ejemplo, específicos para un antígeno CD3, y el otro fragmento Fab que comprende un dominio Fv específico para CLDN18.2. Cada uno de los fragmentos Fab puede componerse de dos cadenas sencillas, un módulo VL-CL y un módulo VH-CH. Alternativamente, cada uno de los fragmentos Fab individuales pueden disponerse en una cadena sencilla, preferentemente, VL-CL-CH-VH, y los dominios variables y constantes individuales pueden conectarse con un conector peptídico. En general, las cadenas sencillas individuales y los fragmentos Fab pueden conectarse mediante puentes disulfuros, dominios adhesivos, unidos químicamente y/o mediante un conector peptídico. La molécula biespecífica puede también comprender más de dos fragmentos Fab, en particular, la molécula puede ser un Fab₃, Fab₄, o un complejo Fab multimérico con especificidad para 2, 3, 4, o más antígenos diferentes. La enseñanza también incluye los Fabs unidos químicamente.

En una modalidad, el agente de unión de acuerdo con la enseñanza incluye varios tipos de fragmentos variables de cadena sencilla (scFvs) bivalentes y trivalentes, proteínas de fusión que mimetizan los dominios variables de dos anticuerpos. Un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de inmunoglobulinas, conectadas con un péptido corto conector de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El conector es generalmente rico en glicina para la flexibilidad, así como también en serina o treonina para la solubilidad, y pueden tanto conectar el N-terminal de la VH con el C-terminal de la VL, o vice versa. Los fragmentos variables de cadena sencilla divalentes (o bivalentes) (di-scFvs, bi-scFvs) pueden ingenierizarse para unir dos scFvs. Esto puede hacerse mediante la producción de una cadena sencilla de péptidos con dos regiones VH y dos VL, lo que produce los scFvs en tándem. La enseñanza también incluye moléculas multiespecíficas que comprenden más de dos dominios de unión scFvs. Esto hace posible que la molécula comprenda múltiples especificidades a antígeno y sea una molécula trispecífica, tetraespecífica, o multiespecífica, o la molécula sea una molécula biespecífica que comprende más de un dominio de unión scFv con especificidad para el mismo antígeno. En particular, la molécula de la enseñanza puede ser un Fv de cadena sencilla multiespecífico.

Otra posibilidad es la creación de scFvs con péptidos conectores que son muy cortos para que las dos regiones variables se plieguen juntas (alrededor de cinco aminoácidos), lo que obliga a dimerizar los scFvs. Este tipo se conoce como diacuerpos. Los conectores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros, llamados triacuerpos o tricuerpos. Los tetracuerpos también se han producido. Estos muestran una afinidad incluso más alta por sus dianas que los diacuerpos.

Un ejemplo particularmente preferido de un fragmento de anticuerpo biespecífico es un diacuerpo (Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772), que es un fragmento de anticuerpo pequeño bivalente y biespecífico. Los diacuerpos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL) conectados por un conector de péptidos que es demasiado corto para permitir el apareamiento de los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el apareamiento con los dominios complementarios de otra cadena y promueve el ensamble de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno funcionales. Para construir los diacuerpos biespecíficos, los dominios V de por ejemplo, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CLDN18.2 pueden fusionarse para crear las dos cadenas VH(CD3)-VL(CLDN 18.2), VH(CLDN18.2)-VL(CD3). Cada cadena por sí misma no es capaz de unirse al antígeno respectivo, pero recrea los sitios de unión a antígeno funcionales cuando se aparea con la otra cadena. Para este fin, se usa un conector de péptidos que es demasiado corto para permitir que se apareen los dos dominios en la misma cadena. Las dos moléculas scFv, con un conector entre el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera que es demasiado

corto para la dimerización intramolecular, se coexpresan y se autoensamblan para formar moléculas biespecíficas con los dos sitios de unión en extremos opuestos.

En una modalidad, la molécula multiespecífica de acuerdo con la enseñanza comprende los dominios variables (VH, VL) y constantes (C) de las inmunoglobulinas. En una modalidad la molécula biespecífica es un minicuerpo, preferentemente, un minicuerpo que comprende dos cadenas sencillas VH-VL-C que se conectan entre sí a través de los dominios constantes (C) de cada cadena. De acuerdo con este aspecto, las correspondientes regiones variables de la cadena pesada (VH), las correspondientes regiones variables de la cadena ligera (VL) y los dominios constantes (C) pueden disponerse, desde el N-terminal hasta el C-terminal, en el orden VH(CLDN18.2)-VL(CLDN18.2)-(C) y VH(CD3)-VL(CD3)-C, en donde C es preferentemente un dominio CH3. El apareamiento de los dominios constantes resulta en la formación del minicuerpo.

De acuerdo con otro aspecto particularmente preferido, el agente de unión biespecífico de la enseñanza está en el formato de una construcción de anticuerpo de cadena sencilla biespecífico, de manera que dicha construcción comprende o consiste en al menos dos dominios de unión, de manera que uno de dichos dominios se une a CLDN18.2 y un segundo dominio se une a otro antígeno, por ejemplo, CD3. Tales moléculas, también denominadas "atrapadores biespecíficos de células T" (BiTEs; el término BiTE solo se refiere a moléculas biespecíficas de las cuales un brazo es específico para CD3) consisten en dos moléculas scFv conectadas a través de un péptido conector.

Como se usa en la presente, un "anticuerpo de cadena sencilla biespecífico" indica una cadena sencilla de polipéptidos que comprende dos dominios de unión. Cada dominio de unión comprende una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH"), en donde la región VH del primer dominio de unión se une específicamente a la CLDN18.2, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente a otro antígeno, por ejemplo, CD3. Los dos dominios de unión se unen opcionalmente entre sí mediante un espaciador corto de polipéptidos. Un ejemplo no limitante para un espaciador de polipéptidos es Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G-G-G-G-S) y repeticiones del mismo. Cada dominio de unión puede comprender adicionalmente una región variable de una cadena ligera de anticuerpo ("región VL"), la región VH y la región VL dentro del cual los dominios de unión primero y segundo se unen entre sí a través de un conector de polipéptidos el tiempo suficiente para permitir que la región VH y la región VL del primer dominio de unión y la región VH y la región VL del segundo dominio de unión se apareen entre sí.

De acuerdo con este aspecto, las correspondientes regiones variables de la cadena pesada (VH), las correspondientes regiones variables de la cadena ligera (VL) pueden disponerse, desde el N-terminal al C-terminal, en el orden VH(CLDN18.2)-VL(CLDN18.2)-VH(CD3)-VL(CD3), VH(CD3)-VL(CD3)-VH(CLDN18.2)-VL(CLDN18.2) o VH(CD3)-VL(CD3)-VL(CLDN18.2)-VH(CLDN18.2). Sin embargo, también se prevé que los anticuerpos de cadena sencilla biespecíficos de la enseñanza comprendan otras disposiciones de los dominios, tales como VL(CLDN18.2)-VH(CLDN18.2)-VH(CD3)-VL(CD3), VL(CLDN18.2)-VH(CLDN18.2)-VL(CD3)-VH(CD3), VH(CLDN18.2)-VL(CLDN18.2)-VL(CD3)-VH(CD3), VL(CD3)-VH(CD3)-VH(CLDN18.2)-VL(CLDN18.2), VL(CD3)-VH(CD3)-VL(CLDN18.2)-VH(CLDN18.2). "CD3" solo se proporciona en la presente descripción como un ejemplo para designar una segunda especificidad de unión a un antígeno.

Un conector largo generalmente conecta las correspondientes regiones variables de la cadena pesada (VH) y las correspondientes regiones variables de la cadena ligera (VL) para crear un dominio de unión scFv mientras que un conector corto generalmente conecta dos dominios de unión scFv. El conector se designa generalmente para proporcionar flexibilidad y resistencia a proteasas, y preferentemente, el conector comprende los residuos de aminoácidos glicina y/o serina. Los conectores cortos de péptidos pueden consistir en 12 aminoácidos o menos tal como 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2, y preferentemente, 5 o 6 aminoácidos. Los conectores cortos de péptidos preferentemente comprenden la secuencia de aminoácidos SGGGS o GGGGS. Los conectores largos de péptidos pueden consistir en 12 o más, tal como 15 a 25 o 15 a 20 o 15 a 18 aminoácidos. Los conectores largos de péptidos preferentemente comprenden las secuencias de aminoácidos (GGGS)₃ o VE(GGSGGS)₂GGVD. Además, los conectores largos de péptidos pueden comprender las secuencias de aminoácidos (GGGS)₄, (GGGS)₅ o GGGGS(GGS)₃GGGS.

Los agentes de unión de acuerdo con la enseñanza pueden también comprender una secuencia de aminoácidos para facilitar la secreción de la molécula, tal como una señal de secreción N-terminal, y/o una o más colas de epítipo que facilitan la unión, purificación o detección de la molécula.

Preferentemente, la señal de secreción es una secuencia señal que permite un paso suficiente a través de la vía secretora y/o la secreción del agente de unión en el ambiente extracelular. Preferentemente, la secuencia señal de secreción es escindible y se elimina del agente de unión maduro. La secuencia señal de secreción se elige preferentemente con respecto a la célula u organismo en donde se produce el agente de unión.

La secuencia de aminoácidos de una cola de epítipo puede introducirse en cualquier posición dentro de la secuencia de aminoácidos del agente de unión, y puede tomar la forma de un lazo dentro de la estructura de la proteína codificada, o puede fusionarse de manera N-terminal o C-terminal al agente de unión. Preferentemente, la cola de epítipo se fusiona de manera C-terminal al agente de unión. La cola de epítipo puede contener un sitio de corte que permite una eliminación de la cola del agente de unión. Dicha cola de epítipo puede ser cualquier tipo de cola de

epítopo que es funcional bajo condiciones nativas y/o desnaturalizantes, preferible una cola de histidina, más preferible una cola que comprende seis histidinas.

5 El agente de unión biespecífico de la enseñanza puede contener, en adición a dicho primer y segundo dominio de unión, un dominio de unión adicional que sirve por ejemplo, para potenciar la selectividad para células tumorales. Esto puede lograrse por ejemplo, al proporcionar dominios de unión que se unen a otros antígenos que se expresan en células tumorales.

10 De acuerdo con la invención, el término "agente de unión a CLDN18.2" además incluye los receptores de antígeno quiméricos (CAR). De acuerdo con la invención el término "receptor de antígeno quimérico (CAR)" es sinónimo de los términos "receptor de célula T quimérico" y "receptor de células T artificial".

15 Estos términos se refieren a receptores ingenierizados, que confieren una especificidad arbitraria tal como la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula inmunitaria efectora tal como una célula T. De esta forma, pueden generarse un gran número de células T específicas de cáncer para la transferencia adoptiva de células. Por lo tanto, un receptor de células T artificial puede estar presente en células T, por ejemplo, en lugar de o en adición al receptor propio de células T de las células T. Tales células T no requieren necesariamente el procesamiento y la presentación de un antígeno para el reconocimiento de la célula diana si no que pueden reconocer preferentemente con especificidad cualquier antígeno presente en una célula diana. Preferentemente, dicho receptor de células T artificial se expresa en la superficie de las células. Para el propósito de la presente invención las células T que comprenden un receptor de células T artificial se comprenden por el término "célula T" como se usa en la presente.

25 En una modalidad, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal se fusiona a CD3-zeta transmembranal y de endodominio. Tales moléculas resultan en la transmisión de una señal zeta en respuesta al reconocimiento por el scFv de su diana antigénica en una célula diana y la muerte de la célula diana que expresa el antígeno diana. Los dominios de reconocimiento de antígenos que también pueden usarse incluyen entre otros las cadenas sencillas alfa y beta del receptor de célula T (TCR). De hecho, casi cualquier cosa que se una a una diana determinada con alta afinidad puede usarse como un dominio de reconocimiento de antígenos.

30 Seguido del reconocimiento de los antígenos, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más utilizado es CD3-zeta. Este transmite una señal de activación a la célula T después de la unión del antígeno.

35 La terapia de transferencia adoptiva de células con células T ingenierizadas con CAR que expresan receptores de antígeno quiméricos es un terapéutico anticancerígeno prometedor debido a que las células T modificadas con CAR pueden ingenierizarse para hacer diana virtualmente cualquier antígeno tumoral. Por ejemplo, las células T de los pacientes pueden ingenierizarse genéticamente para expresar CARs específicamente dirigidos hacia antígenos en las células tumorales de los pacientes, luego son regresadas al paciente.

40 En el contexto de la presente enseñanza, los agentes de unión son preferentemente efectivos terapéuticamente y/o son capaces de generar funciones efectoras inmunitarias como se describe en la presente descripción. Preferentemente, dichas funciones efectoras inmunitarias se dirigen contra células que portan en su superficie el antígeno tumoral CLDN18.2 tales como células cancerosas.

45 El término "efectivo terapéuticamente" se refiere a una efectividad terapéutica cuando se administra a un individuo. El término "efectivo terapéuticamente" además se refiere a la capacidad para cambiar, preferentemente curar, aliviar o parcialmente detener las manifestaciones clínicas de una enfermedad determinada y sus complicaciones en una intervención terapéutica.

50 El término "funciones efectoras inmunitarias" en el contexto de la presente invención incluye cualquier función mediada por los componentes del sistema inmune que resulta por ejemplo, en la inhibición del crecimiento tumoral y/o la inhibición del desarrollo tumoral, que incluye la inhibición de la diseminación tumoral y la metástasis. Preferentemente, las funciones efectoras inmunitarias resultan en la destrucción de células tumorales. Tales funciones comprenden la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), la inducción de apoptosis en las células que portan el antígeno asociado a tumor, la citólisis de las células que portan el antígeno asociado a tumor y/o la inhibición de la proliferación de las células que portan el antígeno asociado a tumor. Los agentes de unión pueden también ejercer un simple efecto mediante la unión a los antígenos asociados a tumor en la superficie de una célula cancerosa. Por ejemplo, los anticuerpos pueden bloquear la función del antígeno asociado a tumor o inducir la apoptosis solo por la unión al antígeno asociado a tumor en la superficie de una célula cancerosa.

La ADCC describe la capacidad de destruir células de las células efectoras, en particular linfocitos, que requieren preferentemente, que la célula diana esté marcada por un anticuerpo.

65 La ADCC ocurre preferentemente cuando los anticuerpos se unen a los antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se enlazan con los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras

inmunitarias. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas que expresan de manera característica los receptores definidos de Fc. La ADCC puede verse como 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. Preferentemente, la inducción *in vivo* de la ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas a los tumores y a respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. Además, las IgG1 e IgG3 son ambas muy efectivas para dirigir la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo resulta en la exposición de sitios de unión múltiples a C1q en estrecha proximidad en los dominios C_H2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estas exposiciones de los sitios de unión a C1q convierten la interacción C1q-IgG, previamente de baja afinidad, en una de alta avidéz, que desencadena una cascada de eventos que involucran una serie de otras proteínas del complemento y que conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de las células efectoras, C3a y C5a. Preferentemente, 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.

Los agentes de unión que se describen en la presente descripción pueden conjugarse a una fracción o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunodepresor) o un radioisótopo. Una citotoxina o agente citotóxico incluyen cualquier agente que es perjudicial a y, en particular, destruye a las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y el platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (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 inmunodepresor. En todavía otra modalidad, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los agentes de unión pueden también conjugarse a un radioisótopo, por ejemplo, iodo 131, itrio 90 o indio 111, para generar radiofármacos citotóxicos.

Las técnicas para conjugar tales fracciones terapéuticas a anticuerpos se conocen bien, ver, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y otros (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y otros (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y otros (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y otros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

El término "unión" de acuerdo con la invención, preferentemente, se refiere a una unión específica.

De acuerdo con la presente enseñanza, 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. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide, por la constante de disociación de equilibrio (K_D). Preferentemente, 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 inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9} M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un agente no es (esencialmente) capaz de unirse a una diana si no tiene una afinidad significativa por dicha diana y no se une significativamente, en particular no se une de manera detectable, a dicha diana en ensayos estándar. Preferentemente, el agente no se une de manera detectable a dicha diana si está presente en una concentración de hasta 2, preferentemente 10, con mayor preferencia 20, en particular 50 o 100 $\mu\text{g/ml}$ o superior. Preferentemente, un agente no tiene afinidad significativa por una diana 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 superior 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 deberá ser al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

Un agente 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 enseñanza, un agente es específico para CLDN18.2 si es capaz de unirse a CLDN18.2 pero no es (esencialmente) capaz de unirse a otras dianas. Preferentemente, un agente es específico para CLDN18.2 si la afinidad por y la unión a tales otras dianas no excede significativamente la afinidad por o la unión a proteínas no relacionadas con CLDN18.2 tales como albúmina de suero bovina (BSA), caseína, albúmina de suero humana (HSA) o proteínas transmembrana que no son claudinas, tales como moléculas del MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un agente 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 de unión a una diana para el que no es específico. Por ejemplo, si la K_D de unión de un agente a la diana para el que es específico es 10^{-7} M, la K_D de unión a una diana para el que no es específico pudiera ser de al menos 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

La unión de un agente a una diana puede determinarse experimentalmente mediante el uso de cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky y otros, "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman y Company New York, N Y (1992), y los métodos que se describen en la presente descripción. Las afinidades pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; mediante el uso de la analítica de resonancia de plasmones de superficie (por ejemplo, BIAcore), mediante el uso de los procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo mediante el antígeno diana radiomarcado; o mediante otro método conocido por el experto en la materia. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard y otros, Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949). La afinidad medida de una interacción particular antígeno anticuerpo puede variar si se mide bajo condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se realizan, preferentemente, con las soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

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

Como se usa en la presente descripción, "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 "presente de manera natural" como se usa en la presente descripción cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, está presente de manera natural una secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluido los virus) que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio.

El término "reordenado" como se usa en la presente descripción se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de la cadena pesada o cadena ligera en donde un segmento V está ubicado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio completo VH o VL, respectivamente. Un locus del gen de la inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado puede identificarse mediante la comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

El término "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en la presente descripción en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en donde el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

En una modalidad, un agente de unión de la enseñanza tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2, es decir, la capacidad de unirse a un epítipo presente en CLDN18.2, preferentemente un epítipo que se localiza dentro de los dominios extracelulares de CLDN18.2, en particular el primer lazo extracelular, preferentemente las posiciones de los 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 que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 preferentemente se une CLDN18.2 pero no a CLDN18.1. Preferentemente, un agente que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 es específico para CLDN18.2. Preferentemente, un agente que tiene la capacidad de unirse a CLDN18.2 se une a CLDN18.2 expresada en la superficie de la célula. En modalidades particulares 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 las células vivas.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 o agente de unión a CLDN18.2 comprende la siguiente combinación de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL): La VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 2 o un fragmento de esta y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 3 o un fragmento de esta.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 o agente de unión a CLDN18.2 comprende la siguiente combinación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras:

La cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 12 o un fragmento de esta y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 13 o un fragmento de esta.

En una modalidad preferida, un dominio de unión para CLDN18.2 o agente de unión a CLDN18.2 comprende el siguiente conjunto de regiones determinantes de la complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3: VH: CDR1: posiciones 45-52 de la sec. con núm. de ident.: 12, CDR2: posiciones 70-77 de la sec. con núm. de ident.: 12, CDR3: posiciones 116-126 de la sec. con núm. de ident.: 12, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la sec. con núm. de ident.: 13, CDR2: posiciones 76-78 de la sec. con núm. de ident.: 13, CDR3: posiciones 115-123 de la sec. con núm. de ident.: 13.

El término "fragmento" se refiere a, en particular, a una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), preferentemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de la cadena pesada (VH) y/o de la región variable de la cadena ligera (VL). En una modalidad dichas una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) 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 la cadena pesada (VH) y/o de la región variable de la cadena ligera (VL).

En una modalidad, como se describe en la presente descripción, un agente de unión que comprende una o más CDRs, un conjunto de CDRs o una combinación de los conjuntos de CDRs comprende dichas CDRs junto con sus regiones marco que intervienen. Preferentemente, la porción incluirá además al menos aproximadamente 50 % de una o ambas de las regiones de marco primera y cuarta donde el 50 % del C-terminal es de la primera región marco y el 50 % del N-terminal es de la cuarta región marco. La construcción de los agentes de unión preparados por técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos N- o C-terminal a las regiones variables codificadas mediante los conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, que incluyen la introducción de conectores para unir las regiones variables de la enseñanza a secuencias adicionales de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulinas, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o etiquetas de proteínas.

En una modalidad como se describe en la presente descripción, un agente de unión que comprende una o más CDRs, un conjunto de CDRs o una combinación de conjuntos de CDRs comprende dichas CDRs en un marco de anticuerpo humano.

El complejo CD3 (agrupación de diferenciación 3) indica un antígeno que se expresa en las células T humanas maduras, timocitos y en un subconjunto de células asesinas naturales como parte del complejo del receptor de célula T multimolecular (TCR). El correceptor de célula T es un complejo de proteínas y se compone de cuatro cadenas distintivas. En mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3 γ , una cadena CD3 δ , y dos cadenas CD3 ϵ . Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como el receptor de célula 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 juntas comprenden el complejo TCR.

CD3 es responsable de la transducción de señales del TCR. Como se describió por Lin y Weiss, Journal de Cell Science 114,243-244 (2001), la activación del complejo TCR por la unión de epítopos de antígenos específicos presentados por el MHC resulta en la fosforilación de motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAMs) por la familia de quinasa Src, lo que desencadena el reclutamiento de quininas adicionales que resulta en la activación de la célula T que incluye la liberación de Ca²⁺. La agrupación de CD3 en las células T, por ejemplo, mediante anticuerpos anti-CD3 inmovilizados, conduce a la activación de la célula T de manera similar a cuando participa el receptor de célula T, pero independiente de su especificidad típica de clon.

Como se usa en la presente, "CD3" incluye CD3 humano e indica un antígeno que se expresa en las células T humanas como parte del complejo multimolecular del receptor de célula T.

Con respecto a CD3, el agente de unión de la enseñanza preferentemente reconoce la cadena épsilon de CD3, en particular, reconoce un epítipo que corresponde a los primeros 27 aminoácidos del N-terminal de CD3 épsilon o fragmentos funcionales de este tramo de 27 aminoácidos.

Los anticuerpos anti-CD3 que son útiles para proporcionar agentes de unión que se unen a CD3 incluyen, pero no se limitan a UCHT1-HS (AcM humanizado), UCHT1-MM (AcM murino), CLB-T3, TR66, 145-2C11.

UCHT1 es un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-CD3 que detecta CD3 en tipos de muestras humanas y primates. CLB-T3 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD3 que se dirige contra el antígeno CD3 y reacciona con el 80-90 % de los linfocitos T periféricos humanos y los timocitos medulares. TR66 es un anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 anti-CD3 que reconoce la cadena épsilon de CD3 humano. 145-2C11 es un anticuerpo monoclonal de hámster armenio anti-CD3 de ratón.

Preferentemente, las regiones VH y VL del dominio de unión a CD3 se derivan de moléculas de anticuerpos/anticuerpo y de moléculas parecidas a anticuerpo que son capaces de reconocer específicamente el CD3 humano en el contexto de otras subunidades del TCR también presentes en las células T humanas primarias activadas que expresan el TCR en su configuración nativa. Las regiones VH y VL derivadas de un anticuerpo específico para la cadena épsilon de CD3 son las más preferidas y dichos anticuerpos (parentales) deben ser capaces de unirse específicamente a epítopos que reflejen la estructura nativa o casi nativa o a un epítipo conformacional de CD3 humano presentado en el contexto del complejo del TCR. En una modalidad preferida de la enseñanza, las regiones VH y VL del dominio de unión a CD3 se derivan de un anticuerpo específico a CD3 seleccionado del grupo que consiste en UCHT1-HS, UCHT1-MM, CLB-T3 y TR66, preferentemente TR66.

Los anticuerpos que se describen en la presente descripción para, por ejemplo, proporcionar las regiones VL y VH pueden producirse mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B o técnicas de presentación en fagos mediante bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal preferido para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, las células de mieloma murino) y procedimientos de fusión se conocen también.

Otros sistemas de animales preferidos para la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y el de conejo (por ejemplo, descrito en Spieker-Polet y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9348 (1995), see also Rossi y otros, *Am. J. Clin. Pathol.* 124: 295 (2005)).

Para generar los anticuerpos, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados a portadores derivados de la secuencia de antígeno, es decir, la secuencia contra la cual los anticuerpos se dirigen, una preparación enriquecida de antígeno expresado de manera recombinante o fragmentos de este y/o células que expresan el antígeno, como se describió. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el antígeno o fragmentos de este. En el caso que de las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno no resulten en anticuerpos, los ratones pueden también inmunizarse con células que expresan el antígeno, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria puede monitorearse en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por la vena de la cola o sangrados retroorbitales. Los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse de manera intraperitoneal o intravenosa con el antígeno que expresan las células 3 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales, pueden aislarse los esplenocitos y las células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser tamizados para la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Los pocillos individuales pueden tamizarse mediante ELISA para hibridomas que secretan anticuerpos. Por análisis de Inmunofluorescencia y FACS mediante el uso de las células que expresan el antígeno, puede identificarse los anticuerpos con especificidad para el antígeno. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden replaquearse, tamizarse de nuevo, y si todavía son positivos para los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse in vitro para generar anticuerpo en medio de cultivo tisular para la caracterización.

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 se media por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los respectivos anticuerpos se quimerizan o humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra por la unión de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, como se describió por Kraus y otros, en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una modalidad preferida los anticuerpos quiméricos se generan por 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 anticuerpos quiméricos pueden generarse por 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 la cadena pesada preferidas para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de la cadena pesada preferidas para la generación de los anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

Por ejemplo, los anticuerpos interactúan con los antígenos dianas, predominantemente, a través de los residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las cadenas pesada y ligera. 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 de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que mimeticen las propiedades de los anticuerpos específicos presentes de manera natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico presente de manera natural injertado en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y otros. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. y otros, (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. y otros, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias génicas del anticuerpo maduro debido a que no incluirán completamente los genes variables ensamblados, que se forman por la unión V (D) J durante la maduración de la célula B. Las secuencias de genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo incluso a lo largo de la región variable.

Debe entenderse que los mimótopos peptídicos y/o los agentes de unión que se describen en la presente descripción pueden suministrarse a un paciente por la administración de un ácido nucleico tal como ARN que codifica el mimótopo peptídico y/o el agente de unión y/o por administración de una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como ARN que codifica el mimótopo peptídico y/o el agente de unión. Por lo tanto, un ácido nucleico que codifica un mimótopo peptídico y/o un agente de unión cuando se administra a un paciente puede presentarse en la forma desnuda o en un vehículo adecuado para el suministro tal como en la forma de liposomas o partículas virales, o dentro de una célula huésped. El ácido nucleico proporcionado puede producir el mimótopo peptídico y/o el agente de unión en períodos de tiempo prolongados en una manera sostenida. Los ácidos nucleicos para suministrarse a un paciente pueden producirse por medios recombinantes. Si un ácido nucleico se administra a un paciente sin estar presente dentro de una célula huésped, es preferentemente captado por las células del paciente para la expresión del mimótopo peptídico y/o el agente de unión que codifica el ácido nucleico. Si un ácido nucleico se administra a un paciente mientras está presente dentro de una célula huésped, es preferentemente expresado por la célula huésped dentro del paciente para producir el mimótopo peptídico y/o agente de unión que codifica el ácido nucleico.

El término "recombinante" en el contexto de la presente invención significa "hecho a través de ingeniería genética". Preferentemente, un "objeto recombinante" tal como un ácido nucleico recombinante en el contexto de la presente invención no está presente de manera natural.

El término "presente de manera natural" como se usa en la presente descripción se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, está presente de manera natural un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (incluido los virus) y que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio.

El término "ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, pretende incluir ADN y ARN tal como moléculas de ADN genómico, ADNc, ARNm, producidas de manera recombinante y sintetizadas de manera química. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN incluye transcritos in vitro de ARN (IVT ARN) o ARN sintético.

Los ácidos nucleicos pueden comprenderse en un vector. EL término "vector" como se usa en la presente descripción incluye cualquiera de los vectores conocidos por la persona experta, que incluye vectores de plásmidos, vectores de cósmidos, vectores de fagos tales como fago lambda, vectores virales tales como vectores de adenovirus o baculovirus, o vectores cromosómicos artificiales tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) o cromosomas artificiales PI (PAC). Dichos vectores incluyen vectores de expresión, así como también de clonación. Los vectores de expresión comprenden los plásmidos, así como también vectores virales y generalmente contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de ADN apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular (por ejemplo, bacteria, levadura, plantas, insectos o mamíferos) o en sistemas de expresión in vitro. Los vectores de clonación se usan generalmente para ingenierizar y amplificar un cierto fragmento de ADN deseado y pueden carecer de las secuencias funcionales necesarias para la expresión de los fragmentos de ADN deseados.

En el contexto de la presente invención, el término "ARN" se refiere a una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos y preferentemente está compuesta totalmente o esencialmente de residuos de ribonucleótidos. "Ribonucleótido" se refiere a un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un grupo β -D-ribofuranosa. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tales como ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido de manera recombinante, así como también ARN modificado que difiere del ARN presente de manera natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, a uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN pueden comprender también nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos que no están presentes de manera natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden referirse como análogos o análogos de ARN presentes de manera natural.

De acuerdo con la presente invención, el término "ARN" incluye y preferentemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcripto" que puede producirse mediante el uso de ADN como molde y codifica un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región no traducida 5' (5'-UTR), una región que codifica la proteína o péptido y una región no traducida 3' (UTR 3'). El ARNm tiene una vida media limitada en las células e in vitro. Preferentemente, el ARNm se produce por transcripción in vitro mediante el uso de un molde de ADN. En una modalidad de la enseñanza, el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química. La metodología de la transcripción in vitro se conoce por la persona experta. Por ejemplo, existe una variedad de kits de transcripción in vitro disponibles de manera comercial.

En una modalidad de la presente enseñanza, el ARN es ARN autorreplicante, tal como ARN autorreplicante monocatenario. En una modalidad, el ARN autorreplicante es ARN monocatenario de sentido positivo. En una modalidad, el ARN autorreplicante es ARN viral o ARN derivado de ARN viral. En una modalidad, el ARN autorreplicante es un ARN genómico alfaviral o se deriva de un ARN genómico alfaviral. En una modalidad, el ARN autorreplicante es un vector de expresión génica viral. En una modalidad, el virus es el virus del bosque Semliki. En una modalidad, el ARN autorreplicante contiene uno o más transgenes, al menos uno de dichos transgenes codifica el mimótopo peptídico/agente de unión que se describe en la presente descripción. En una modalidad, si el ARN es ARN viral o derivado de ARN viral, los transgenes pueden reemplazar parcialmente o completamente las secuencias virales tal como las secuencias virales que codifican proteínas estructurales. En una modalidad, el ARN autorreplicante es el ARN transcrito *in vitro*.

Para aumentar la expresión y/o la estabilidad del ARN utilizado de acuerdo con la presente invención, puede modificarse, preferentemente sin alterar la secuencia del péptido o proteína expresada.

El término "modificación" en el contexto de ARN como se usa de acuerdo con la presente invención incluye cualquier modificación de ARN que no está presente de manera natural en dicho ARN.

En una modalidad de la enseñanza, el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza no tiene 5'-trifosfatos sin caperuza. La eliminación de tales 5'-trifosfatos sin caperuza puede lograrse al tratar el ARN con una fosfatasa.

El ARN de acuerdo con la enseñanza puede tener ribonucleótidos modificados presentes de manera natural o sintética para aumentar su estabilidad y/o disminuir su citotoxicidad. Por ejemplo, en una modalidad, en el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza se sustituye parcialmente o completamente, preferentemente completamente, la 5-metilcitolina por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una modalidad, en el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza se sustituye parcialmente o completamente, preferentemente completamente, la pseudouridina por uridina.

En una modalidad, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con una caperuza 5' o un análogo de la caperuza 5'. El término "caperuza 5'" se refiere a una estructura de caperuza que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y generalmente consiste en un nucleótido de guanosina que se conecta al ARNm a través de un enlace trifosfato inusual 5' a 5'. En una modalidad, esta guanosina se metila en la posición 7. El término "caperuza 5' convencional" se refiere a una caperuza 5' de ARN presente de manera natural, preferentemente a la caperuza 7-metilguanosa (m7G). En el contexto de la presente enseñanza, el término "caperuza 5'" incluye un análogo de la caperuza 5' que se asemeja a la estructura de la caperuza de ARN y se modifica para que posea la capacidad de estabilizar el ARN si se une a este, preferentemente in vivo y/o en una célula.

Proporcionar un ARN con una caperuza 5' o análogo de la caperuza 5' puede lograrse por transcripción in vitro de un molde de ADN en presencia de dicha caperuza 5' o análogo de la caperuza 5', en donde dicha caperuza 5' se incorpora cotranscripcionalmente a la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, por transcripción in vitro, y la caperuza 5' puede unirse al ARN de manera postranscripcional mediante enzimas que añaden la caperuza, por ejemplo, las enzimas que añaden la caperuza del virus vaccinia.

El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN utilizado en la presente enseñanza puede ser una extensión o acortamiento de la cola de poli (A) presente de manera natural o una alteración de las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3' tal como la introducción de una UTR que no se relaciona con la región codificante de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de una o más, preferentemente dos copias de una UTR 3' derivada de un gen de globina, tal como alfa2 globina, alfa1 globina, betaglobina, preferentemente betaglobina, con mayor preferencia betaglobina humana.

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

Preferentemente, el ARN si se suministra a, es decir, se transfecta en, una célula, en particular una célula presente in vivo, expresa la proteína o péptido que codifica.

El término "transfección" se refiere a la introducción de ácidos nucleicos, en particular ARN, en una célula. Para los propósitos 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 tal célula, en donde la célula puede estar presente en un sujeto, por ejemplo, un paciente. Por lo tanto, de acuerdo con la presente enseñanza, una célula para la transfección de un ácido nucleico descrito en la presente descripción 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 enseñanza, la transfección puede ser transiente o estable. Para algunas aplicaciones de la transfección, es suficiente si el material genético transfectado se expresa solo transientemente. Como el ácido nucleico que se introduce en el proceso de transfección no se integra usualmente 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 ácido nucleicos reducen grandemente la tasa de la dilución. Si se desea que el ácido nucleico transfectado permanezca realmente en el genoma de la célula y sus células hijas, debe ocurrir una transfección estable. El ARN puede transfectarse en las células para expresar transientemente su proteína codificada.

El término "estabilidad" del ARN se refiere a la "vida media" del ARN. La "Vida media" se refiere al período de tiempo que se necesita para eliminar la mitad de la actividad, cantidad, o número de moléculas. En el contexto de la presente invención, la vida media de un ARN es indicativo de la estabilidad de dicho ARN. La vida media del ARN puede influenciar la "duración de la expresión" del ARN. Puede esperarse que el ARN que tiene una vida media larga se expresará por un periodo de tiempo prolongado.

En el contexto de la presente invención, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe a ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término "transcripción" comprende "*transcripción in vitro*", en donde el término "*transcripción in vitro*" se refiere a un proceso en donde el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza *in vitro* en un sistema libre de células, preferentemente mediante el uso de extractos celulares apropiados. Preferentemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y se abarcan de acuerdo con la presente invención por el término "vector".

El término "traducción" de acuerdo con la invención se refiere al proceso en los ribosomas de una célula por el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamble de una secuencia de aminoácidos para hacer un péptido o proteína.

El término "expresión" se usa 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. Comprende también la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transiente o estable. De acuerdo con la enseñanza, el término expresión incluye también una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

De acuerdo con la invención "expresión aberrante" o "expresión anormal" significa que la expresión se altera, preferentemente se aumenta, en comparación con una referencia por ejemplo, un estado en un individuo que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una cierta proteína, por ejemplo, un antígeno tumoral. Un aumento de 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 una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

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 primariamente en la mucosa gástrica, y no se expresa en otros tejidos o no se expresa en un grado significativo en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido, tal como el testículo, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica. En algunas modalidades, un antígeno tumoral también puede expresarse específicamente bajo condiciones normales en más de un tipo de tejido u órgano, tal como en 2 o 3 tipos de tejidos u órganos, pero preferentemente en no más de 3 tipos diferentes de tejidos u órganos. En este caso, el antígeno tumoral se expresa entonces específicamente en estos órganos. Por ejemplo, si un antígeno tumoral se expresa bajo condiciones normales, preferentemente, en un grado aproximadamente igual en pulmón y estómago, dicho antígeno tumoral se expresa específicamente en pulmón y estómago.

De acuerdo con la invención, el término "ARN codificante" significa que el ARN, si está presente en el ambiente apropiado, preferentemente dentro de una célula, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

De acuerdo con la invención, el término "péptido" comprende oligo- y polipéptidos y se refiere a las sustancias que comprenden dos o más, preferentemente 3 o más, preferentemente 4 o más, preferentemente 6 o más, preferentemente 8 o más, preferentemente 9 o más, preferentemente 10 o más, preferentemente 13 o más, preferentemente 16 o más, preferentemente 21 o más y hasta preferentemente 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular

100 aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferentemente, a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en la presente descripción.

5 De acuerdo con la invención, un péptido puede incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En una modalidad, un péptido simplemente incluye aminoácidos naturales.

De acuerdo con la invención, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura diferente de aquellas especies de los 20 aminoácidos naturales. Dado que los aminoácidos no naturales tienen estructuras similares a aquellas de los aminoácidos naturales, los aminoácidos no naturales pueden clasificarse como derivados o análogos de determinados aminoácidos naturales.

De acuerdo con la invención, el término "péptido cíclico" se refiere a una cadena de péptido o polipéptido que forma un anillo. Un péptido puede ciclarse en cuatro maneras diferentes: cabeza a cola (C-terminal a N-terminal), cabeza a cadena lateral, cadena lateral a cola o cadena lateral a cadena lateral. Los péptidos particularmente preferidos de acuerdo con la invención son los que contienen dos o más residuos que contienen grupos tioles tal como cisteínas que pueden formar puentes disulfuros intramoleculares lo que resulta en péptidos cíclicos.

De acuerdo con la invención, un mimótopo peptídico puede unirse covalentemente o no covalentemente a uno o más otros compuestos. Tales compuestos incluyen compuestos peptídicos tales como péptidos y proteínas, así como también compuestos no peptídicos tal como polietilenglicol (PEG).

En una modalidad, los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción son PEGilados. La PEGilación es el proceso de unión covalente de las cadenas del polímero polietilenglicol (PEG) a otra molécula, tal como un péptido o proteína. La unión covalente de PEG puede "enmascarar" el agente del sistema inmune del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas), y aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente lo que prolonga su tiempo en circulación mediante la reducción del aclaramiento renal. La PEGilación puede proporcionar también solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrofóbicas.

La enseñanza dada en la presente descripción con respecto a secuencias de aminoácidos específicas, por ejemplo, aquellas que se muestran en el listado de secuencias, se debe interpretar para que, además, se relacionen las variantes de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a aquellas de las secuencias de aminoácidos específicas. Una propiedad importante es conservar la unión a una diana o mantener las funciones efectoras. Preferentemente, una secuencia que es una variante con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a CLDN18.2 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente descripción, por ejemplo, la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

Los expertos en la técnica apreciarán que en particular las secuencias de las CDR, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLDN18.2. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en la presente descripción. Por "altamente homóloga" se contempla que de 1 a 5, preferentemente, de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren homología sustancial con las regiones de anticuerpos específicamente descritos en la presente descripción.

Para los propósitos de la presente invención, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de delección de aminoácidos que comprenden la delección en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína se denominan también variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

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

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

Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tal como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos. Las delecciones pueden estar en cualquier posición de la proteína.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. La preferencia está dada a las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de

aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son cambios conservativos de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio conservativo de aminoácidos involucra la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos presentes de manera natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), aminoácidos básicos (lisina, arginina, histidina), aminoácidos no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). En algunas ocasiones la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente el grado de similitud, preferentemente de identidad entre una secuencia de aminoácidos determinada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de la secuencia de aminoácidos determinada será al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. El grado de similitud o de identidad está dado preferentemente 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 de identidad se da preferentemente por 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, preferentemente aminoácidos continuos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la técnica, preferentemente mediante el uso del mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, mediante el uso de Align, a través del uso de configuraciones estándar, preferentemente, 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 conservativas de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después del mejor alineamiento, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales con similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, se divide este número por el número de posiciones comparadas y se multiplica por 100 el resultado obtenido de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

El término "célula" o "célula huésped" preferentemente se refiere a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no libera sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, organelos, o material genético. Una célula intacta preferentemente es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferentemente, dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que puede transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferentemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno puede expresar el ácido nucleico.

Como se usa en la presente descripción "Reducir", "disminuir" o "inhibir" significan una disminución global o la capacidad para causar una disminución global, preferentemente de 5 % o mayor, 10 % o mayor, 20 % o mayor, con mayor preferencia de 50 % o mayor, y con la máxima preferencia de 75 % o mayor, 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 "potenciar", preferentemente, se refieren a un aumento o potenciación de aproximadamente al menos un 10 %, preferentemente al menos 20 %, preferentemente al menos 30 %, con mayor preferencia al menos 40 %, con mayor preferencia al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 80 %, y con la máxima preferencia al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10000 % o incluso más.

Los mimótopos peptídicos descritos en la presente descripción pueden usarse en ensayos para evaluar la presencia o la cantidad de CLDN18.2 o anticuerpos CLDN18.2, en particular los anticuerpos CLDN18.2 que se describen en la presente descripción. Tales ensayos pueden llevarse a cabo en una serie de formas, que incluyen, pero no se limitan a inmunodetección, e incluyen ELISA, en particular ELISA de péptidos, ensayos de unión competitiva, y similares. En general, en tales ensayos se usa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente al péptido o proteína diana y que se une directamente o indirectamente a una etiqueta que se proporciona para la detección, por ejemplo, enzimas indicadoras, radiomarcas, fluoróforos, o partículas paramagnéticas. Los métodos de la enseñanza permiten evaluaciones cuantitativas y/o cualitativas, por ejemplo, evaluaciones absolutas y/o relativas, de CLDN18.2 o anticuerpos CLDN18.2.

El término "ensayo de inmuoabsorción ligado a enzimas o ELISA", como se usa en la presente descripción, se refiere a un método para determinar cuantitativamente o semicuantitativamente las concentraciones de proteína de una muestra, por ejemplo, plasma sanguíneo, suero o extractos de célula/tejido, en un formato de placa de múltiples pocillos (usualmente 96 pocillos por placa). En general, las proteínas en solución se adsorben a las placas ELISA. Los anticuerpos específicos para la proteína de interés pueden usarse para sondear la placa. El fondo se minimiza por optimización de los métodos de bloqueo y lavado (como para IHC), y la especificidad se asegura a través de la presencia de controles positivos y negativos. Los métodos de detección son usualmente colorimétricos o basados en quimioluminiscencia.

De acuerdo con la enseñanza, una etiqueta puede funcionar para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o la segunda etiqueta, por ejemplo, FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, mediante la carga, la hidrofobicidad, la forma, u otros parámetros físicos; o (iv) proporcionar una fracción de captura, por ejemplo, afinidad, anticuerpo/antígeno, o formación de complejos iónicos. Adecuadas como etiquetas son las estructuras, tales como etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, etiquetas cromóforas, etiquetas radioisotópicas, etiquetas isotópicas, preferentemente etiquetas isotópicas estables, etiquetas isobáricas, etiquetas enzimáticas, etiquetas de partículas, en particular etiquetas de partículas metálicas, etiquetas de partículas magnéticas, etiquetas de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o de moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lecitinas, secuencias de etiquetas que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes de unión, etcétera. Las etiquetas comprenden, en una manera no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y de radiodiagnóstico, que incluyen los emisores de positrones tales como flúor 18 y carbono 11, emisores gamma tales como yodo 123, tecnecio 99m, yodo 131 e indio 111, núclidos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

El término "muestra", como se usa en la presente descripción, incluye cualquier muestra biológica que puede aislarse de un paciente y usarse para propósitos de análisis. Dicha muestra puede ser una muestra de fluido corporal, una muestra de tejido, o una muestra celular. Por ejemplo, las muestras abarcadas por la presente enseñanza son muestras de tejidos (por ejemplo, sección o explante), muestras de células individuales, muestras de colonias celulares, muestras de cultivo celular, muestras sanguíneas (por ejemplo, sangre total o fracción de sangre tal como fracción de células sanguíneas, suero o plasma), muestras de orina, o muestras de otras fuentes periféricas. Dichas muestras pueden mezclarse o combinarse, por ejemplo, una muestra puede ser una mezcla de una muestra sanguínea y muestra de orina. Dichas muestras pueden proporcionarse mediante la eliminación de un fluido corporal, célula(s), colonias celulares, un explante, o una sección de un paciente, pero pueden proporcionarse también mediante el uso de una muestra aislada previamente. Por ejemplo, una muestra de tejido puede eliminarse de un paciente mediante técnicas convencionales de biopsia o una muestra sanguínea puede tomarse de un paciente mediante técnicas convencionales para colectar la sangre. La muestra, por ejemplo, muestra de tejido o muestra sanguínea, puede obtenerse de un paciente previo al inicio del tratamiento terapéutico, durante el tratamiento terapéutico, y/o después del tratamiento terapéutico.

En una modalidad, la muestra es una muestra de fluido corporal. El término "muestra de fluido corporal", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier muestra líquida derivada del cuerpo de un paciente. Dicha muestra de fluido corporal puede ser una muestra sanguínea, una muestra de orina, una muestra de esputo, una muestra de leche materna, muestra de fluido cerebroespinal (CSF), muestra de cerumen (cera de los oídos), muestra de endolinfa, muestra de perilinfa, muestra de jugo gástrico, muestra de moco, muestra de fluido peritoneal, muestra de fluido pleural, muestra de saliva, muestra de sebo (aceite de la piel), muestra de semen, muestra de sudor, muestra de lágrimas, muestra de secreción vaginal, o muestra de vómito que incluye componentes o sus fracciones. Dichas muestras de fluidos corporales pueden mezclarse o combinarse. Por lo tanto, una muestra de fluido corporal puede ser una mezcla de una muestra sanguínea y orina o una mezcla de una muestra sanguínea y cerebroespinal. Dicha muestra de fluido corporal puede proporcionarse mediante la extracción de un líquido corporal de un paciente, pero también puede proporcionarse al usar material de muestra de fluido corporal previamente aislado. En una modalidad preferida, la muestra es una muestra sanguínea total o una muestra de fracción de sangre tal como una fracción de células de la sangre, suero de la sangre, o muestra de plasma de la sangre.

Los agentes tales como los mimótopos peptídicos que se describen en la presente descripción pueden administrarse en la forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

5 Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son preferentemente estériles y contienen una cantidad efectiva de los agentes que se describen en la presente descripción y opcionalmente de los agentes adicionales como se discute en la presente descripción para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

10 Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma uniforme de dosificación y pueden prepararse en una forma conocida per se. Una composición farmacéutica puede estar por ejemplo, en la forma de una solución o una suspensión.

15 Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tamponantes, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes todos los cuales son preferentemente aceptables farmacéuticamente. El término "aceptable farmacéuticamente" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

20 Las sales que no son aceptables farmacéuticamente pueden usarse para preparar sales aceptables farmacéuticamente y se incluyen en la enseñanza. Las sales aceptables farmacéuticamente de este tipo comprenden de manera no limitante, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Las sales aceptables farmacéuticamente pueden prepararse también como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

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

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

30 Una formulación inyectable puede comprender un excipiente aceptable farmacéuticamente tal como Lactada de Ringer.

35 El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de una naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina para facilitar, potenciar o permitir la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "portador" también incluye uno o más agentes de relleno compatibles sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación, que son adecuadas para la administración a un paciente.

40 Las sustancias portadoras posibles para la administración parenteral son por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactada de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros de lactida biocompatibles, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxieteno/polioxipropileno.

45 El término "excipiente" cuando se usa en la presente descripción pretende indicar todas las sustancias que pueden presentarse en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes activos de superficie, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes saborizantes, o colorantes.

50 Los agentes y composiciones que se describen en la presente descripción se administran en cantidades efectivas. Una "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una condición particular, la reacción deseada se relaciona, preferentemente, con la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende enlentecer el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una condición puede ser también un retraso en la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o de dicha condición.

55 Una cantidad efectiva de un agente o composición que se describen en la presente descripción dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, la condición fisiológica, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si está presente), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes que se describen en la presente descripción pueden depender de varios de estos parámetros. En el caso que una reacción en un paciente es insuficiente con una dosis inicial, pueden usarse dosis más altas (o dosis efectivamente mayores alcanzadas por una vía de administración diferente, más localizada).

65 Los agentes y composiciones que se describen en la presente descripción pueden administrarse a los pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como aquellos que se describen en la presente descripción. Los pacientes preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la administración de los agentes y composiciones que se describen en la presente descripción. Esto incluye trastornos que involucran las células caracterizadas por un patrón alterado de la expresión de CLDN18.2.

Por ejemplo, en una modalidad, los agentes que se describen en la presente descripción pueden usarse para tratar un paciente con una enfermedad cancerígena, por ejemplo, una enfermedad cancerígena tal como se describe en la presente descripción caracterizada por la presencia de célula cancerosas que expresan CLDN18.2.

- 5 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento que se describen de acuerdo con la enseñanza pueden usarse también para la inmunización o la vacunación para prevenir una enfermedad que se describe en la presente descripción.

10 La composición farmacéutica de la enseñanza puede administrarse junto con sustancias suplementarias que potencian la inmunidad tales como uno o más adyuvantes y pueden comprender una o más sustancias que potencian la inmunidad para aumentar además su efectividad, preferentemente para lograr un efecto sinérgico de inmunoestimulación. El término "adyuvante" se refiere a los compuestos que prolongan o potencian o aceleran una respuesta inmunitaria. Con respecto a esto, son posibles varios mecanismos, en dependencia de los tipos diferentes de adyuvantes. Por ejemplo, los compuestos que permiten la maduración del DC, por ejemplo, lipopolisacáridos o ligando CD40, forman una primera clase de adyuvantes adecuados. Generalmente, cualquier agente que influya en el sistema inmune del tipo de una "señal de peligro" (LPS, GP96, ARNs etc.) o citocinas, tal como GM-CSF, puede usarse como un adyuvante que permite una respuesta inmunitaria para intensificarla y/o influenciarla de una manera controlada. Los oligodeoxinucleótidos CpG pueden también usarse opcionalmente en este contexto, aunque deben considerarse sus efectos secundarios que se presentan bajo ciertas circunstancias, como se explicó antes. Los adyuvantes particularmente preferidos son las citocinas, tal como monocinas, linfocinas, interleucinas o quimocinas, 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 aceite tal como Montanide®, el más preferido Montanide® ISA51. Los lipopéptidos, tal como Pam3Cys, también son adecuados para su uso como adyuvantes en la composición farmacéutica de la presente enseñanza.

25 La composición farmacéutica puede administrarse localmente o sistémicamente, preferentemente sistémicamente.

30 El término "administración sistémica" se refiere a la administración de un agente de manera que el agente se distribuya ampliamente en el cuerpo de un individuo en cantidades significativas y desarrolle un efecto deseado. Por ejemplo, el agente puede desarrollar su efecto deseado en la sangre y/o alcanza su sitio de acción deseado a través del sistema vascular. Las rutas de administración sistémica típicas incluyen la administración mediante la introducción del agente directamente en el sistema vascular o la administración oral, pulmonaria, o intramuscular en donde el agente se adsorbe, entra al sistema vascular, y se porta a uno o más sitio(s) de acción deseado(s) a través de la sangre.

35 De acuerdo con la presente invención, se prefiere que la administración sistémica sea mediante la administración parenteral. El término "administración parenteral" se refiere a la administración de un agente de manera que el agente no pase por el intestino. El término "administración parenteral" incluye la administración intravenosa, la administración subcutánea, la administración intradermal o la administración intraarterial pero no se limita a estas.

40 La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

45 Ejemplo 1: Materiales y métodos:

Selección por presentación en fagos: Los péptidos de unión a IMAB362 se identificaron por la tecnología de presentación en fagos mediante el uso de un kit de biblioteca de péptidos de presentación en fagos Ph.D.™-C7C (New England Biolabs) con un protocolo de selección en fase de solución. Para la selección 50 μ l de Proteína A Dynabeads (Invitrogen) se lavaron una vez con 1 ml de tampón TBST (50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl + Tween-20 al 0,1 %) y posteriormente se bloquearon con 1 ml de tampón de bloqueo (BSA al 3 % en TBS) durante 1 h a 4 °C. Después, las perlas se lavaron cuatro veces con 1 ml de tampón TBS-T. Una representación de 100 veces la biblioteca (1E+11 fagos) se incubó con 100 nM del anticuerpo durante 20 min a temperatura ambiente. Los fagos unidos al anticuerpo se capturaron con las perlas de Proteína A bloqueadas mediante la incubación durante 15 min a temperatura ambiente con agitación ligera. Después de la incubación, las perlas se lavaron diez veces con TBST para eliminar los fagos no unidos. La elución se realizó por incubación posterior con 50 μ l de 100 mM de trietilamina (durante 6 min) y 50 μ l de 100 mM de glicina-HCl, pH 2 (durante 10 min). Los eluatos se combinaron e inmediatamente se neutralizaron con 100 μ l de 1 M de Tris-HCl, pH 7. La amplificación de los fagos neutralizados se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante la infección de células de *E. coli* ER2738 en fase logarítmica. Los fagos amplificados se purificaron del sobrenadante de *E. coli* también como se describe en el manual NEB mediante precipitación doble con PEG. Los fagos purificados se cuantificaron de manera fotométrica y se usaron para rondas posteriores de selección. Se realizaron dos rondas adicionales de tamizaje con concentración menor de anticuerpos (50 nM) y se lavó con mayor rigor (lavado con Tween al 0,5 %).

65 Análisis de los clones de fagos individuales: Después de la tercera ronda de tamizaje, los clones de fagos individuales se generaron y probaron para la unión a la diana en un ELISA de fagos directo. Para este propósito, 1E+12 fagos se recubrieron en una placa de 96 pocillos Maxisorp™ (Thermo Fisher Scientific) en tampón de recubrimiento (50 mM de

carbonato de sodio, pH 9,4) durante 1 h a 37 °C. Se recubrieron ocho pocillos separados por clon. El líquido se descartó y los pocillos se bloquearon toda la noche a 4 °C con 300 µl de tampón de bloqueo (BSA al 3 % en tampón TBS). Después de lavar dos veces con 300 µl de tampón TBS por pocillo, se realizó la incubación con 500 nM de IMAB362 o dianas controles, Rituximab o fragmento Fc de hulgG (Merck Millipore; 100 µl por pocillo, diluido con BSA al 0,3 % en TBS) durante 90 min a 4 °C. Los pocillos se lavaron tres veces con TBS-T y dos veces con TBS. Luego los fagos unidos se detectaron con el anticuerpo IgG anti-humano de cabra conjugado a HRP (Sigma-Aldrich, diluido 1:5000 con BSA al 0,3 % en TBS) y con el sustrato TMB. Para el análisis de secuencia, el ADN de los fagos se aisló mediante el uso del kit QIAprep Spin M13 (Qiagen).

Optimización de los péptidos con microarreglos de péptidos: Los péptidos se sintetizaron e imprimieron sobre las laminillas del microarreglo de péptidos esencialmente como se describió previamente [Funkner, A. y otros, J. Mol. Biol. 2013, 425, 1340-1362]. En resumen, los péptidos se sintetizaron mediante el uso de síntesis de SPOT [Wenschuh, H. y otros, Biopolymers 2000, 55, 188-206] se escindieron del soporte sólido y se ciclaron (DMSO al 50 %, tampón PBS pH 7-8, temperatura ambiente, 16 horas). Posteriormente, todos los péptidos se inmovilizaron quimioselectivamente sobre laminillas de vidrio funcionalizadas como se describió anteriormente [Funkner, A. y otros, J. Mol. Biol. 2013, 425, 1340-1362]. Cada péptido se depositó en el microarreglo por triplicado.

Los microarreglos se incubaron con 1,0 o 0,1 µg/ml de IMAB362 en una estación de procesamiento de microarreglos HS 4800 (Tecan) durante dos horas a 30 °C, seguido de la incubación con 1,0 µg/ml de anticuerpo secundario marcado de manera fluorescente (anticuerpo Fc anti-humano Alexa647; Jackson Immuno Research). Se realizaron etapas de lavado antes de cada etapa de incubación con Tween-20 al 0,1 % en TBS 1x. Después de la etapa de incubación final los microarreglos se lavaron (Tween-20 al 0,05% en SSC 0,1x) y secaron en una corriente de nitrógeno. Cada microarreglo se escaneó mediante el uso de GenePix Autoloader 4200AL (Molecular Devices, tamaño de pixel: 10 µm). Las intensidades de las señales se evaluaron mediante el uso del software de análisis GenePix Pro 7.0 (Molecular Devices). Para cada péptido, se calculó la media de los tres triplicados.

El valor del límite inferior de cuantificación (LLQ) se definió como $LLQ = \text{mediablanc}o + 6 * SD_{\text{blanc}o}$. Se determinó mediante la gráfica de los valores de DO (405 nm) contra la concentración de IMAB362 en el intervalo lineal (0-25 ng/ml) y el análisis *a través de* la regresión lineal.

La evaluación posterior de los resultados se realizó mediante el uso del software de cálculos estadísticos y gráficos R (Versión 2.15.2, www.r-project.org).

Síntesis de los péptidos purificados: Los péptidos mostrados en la Tabla 2 se sintetizaron mediante protocolos estándar de síntesis en fase sólida basados en Fmoc y se purificaron. Todos los péptidos dianas se obtuvieron con una pureza >80 %. Ver la información suplementaria para detalles.

Análisis de la unión mediante interferometría de biocapa: El análisis de la unión se realizó mediante el uso de sensores de estreptavidina (SA) en un sistema Octet Red (FortéBIO). Se usaron 5 µg/ml de péptidos biotinilados para la carga (200 µl por sensor). Se usó tampón de bloqueo 1x (Sigma-Aldrich) para evitar la unión inespecífica en cada etapa después de la carga. Los sitios de unión a biotina remanentes en los sensores de estreptavidina recubiertos se bloquearon mediante el uso de 100 µg/ml de biocitina (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Para el análisis del modo de unión de diferentes péptidos se usó 500 nM de anticuerpo IMAB362 en la etapa de asociación. Para el análisis de la KD se usó el anticuerpo en un intervalo de 15,625 a 500 nM (15,625, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 nM) para cada péptido analizado. Se utilizó el siguiente programa:

Línea base: 1000 rpm durante 180 seg.

Carga 1000 rpm durante 900 seg.

Línea base: 1000 rpm durante 180 seg.

Bloqueo: 1000 rpm durante 300 seg.

Asociación: 1000 rpm durante 1200 seg.

Disociación: 1000 rpm durante 1200 seg.

Análisis de la unión mediante ELISA de péptidos: Para la detección de IMAB362, los péptidos que mimetizan CLDN18.2 se inmovilizaron en placas con estreptavidina (Nunc) en una concentración de 0,75 µg/ml en tampón PBS durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0,01 % en tampón PBS) antes del bloqueo con BSA al 3 % en PBS toda la noche a 4 °C. Para detectar IMAB362, la placa bloqueada se lavó de nuevo tres veces con tampón de lavado seguido por la adición de IMAB362 y la incubación durante 30 min a 37 °C. Después de otra etapa de lavado, se incubó con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a la fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research) durante otros 30 min a 37 °C. Finalmente, la placa se lavó de nuevo antes de incubarse con 1,5 mg/ml del sustrato PNPP (para-nitrofenil fosfato) en el tampón apropiado para el sustrato

(1 M de Dietanolamina, 0,05 mM de MgCl₂, acida de sodio al 0,01 %, pH 9,8) durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se usó 3 M de KOH para detener la reacción enzimática. La absorbancia se midió con un lector de microplacas (Infinite M200, Tecan). Para el análisis dual de longitud de onda, se eligió 405 nm como longitud de onda de medición y 492 nm como longitud de onda de referencia. Los valores de absorbancia se calcularon por la sustracción de los valores medidos para la longitud de onda de referencia y para la longitud de onda de medición. El cálculo de los valores de KD aparentes se realizó por el ajuste de los datos con Sigma Plot 10 mediante el uso de un modelo de unión de saturación de dos sitios.

Para analizar la influencia del suero, el suero murino tomado de ratones Balb/cJ o suero humano de tipo AB (Lonza) se agregó a las muestras de ELISA y el ensayo se realizó como se describió anteriormente.

Análisis farmacocinético In vivo: Se inyectó intravenosamente a ratones Balb/cJ hembras de 11 semanas (6 ratones por grupo) IMAB362 (1 mg/ratón, aproximadamente 50 mg/kg en tampón de PBS), Rituximab (1 mg/ratón, aproximadamente 50 mg/kg en tampón de PBS) o tampón solo (PBS). Después de 8, 24, 48, 72, 144, 168 y 192 hrs, se tomaron las muestras sanguíneas de dos ratones de cada grupo para la preparación del suero. Las muestras de suero se midieron en el intervalo lineal del ensayo (aproximadamente 0,3-300 ng/ml). Por lo tanto, las muestras de suero se diluyeron 1:50000 con tampón PBS que contenía BSA al 0,2 % (contenido de suero final del 0,002 %) y se analizaron mediante ELISA de péptidos como se describió anteriormente mediante el uso del péptido mimótopo 2c para la captura de anticuerpos. Una fila estándar con IMAB362 en presencia de suero murino control de Balb/cJ se ensayó en paralelo (0-25 ng/ml). Los datos en bruto estándar se ajustaron por regresión lineal para calcular la concentración de anticuerpo de las muestras de ratones en el respectivo tiempo. Antes del análisis farmacocinético, se obtuvo un permiso para el experimento con animales de la autoridad local competente.

Síntesis de péptidos

Materiales Todos los solventes se usaron sin purificación adicional. El agua se desmineralizó con un sistema de desmineralización (Milli-Q Plus, Millipore). Los reactivos se adquirieron de Advanced ChemTech (Louisville, KY, EE.UU), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania), Bachem (Basel, Schweiz), J.T. Baker (Phillipsburg, EE.UU), NeoMPS (Strassburg, Francia), GL Biochem (Shanghai, China) o Merck Chemicals (Nottingham, GB) y se usaron sin purificación adicional.

Equipo: El análisis RP-HPLC-MS se realizó con un sistema Agilent Series 1200 (bomba binaria serie 2x1200 SL G1312B, compartimiento de columna termostaticado 1200 SL G1316B, inyector automático de alto rendimiento de la serie 1200 SL G1367C, desgasificador de micro-vacío serie 1200 G1379B, interfaz de automatización G2254A 1100/1200, manipulador de placa de pozo G2255A 1100/1200, detector de VWD-UV G1314B, válvula G1158A, y ESI-MS acoplado (sistema Agilent LC/MSD Quad SL G1956B) en una columna Phenomenex Gemini-NX-3u a 30 °C y un flujo de 1,0 ml/min con un gradiente lineal (595 % de B en 6 min, con A: 0,05 % de TFA en agua y B: 0,05 % de TFA en MeCN) y detección de UV a una longitud de onda de 220 nm. Se realizaron separaciones preparativas en un sistema HPLC 3000 Dionex UltiMate con gradientes adecuados (solvente A: 0,05 % de TFA en agua, solvente B: 0,05 % de TFA en MeCN) y detección de UV a 220 nm.

Métodos general para la síntesis de péptidos: El aminoácido C-terminal (Fmoc-Gly-OH) se acopló a resina de poliestireno de clorotritil (100-400 mg) para producir una carga de aproximadamente 0,3 mmol/g. Seguido de la desprotección de Fmoc con una solución de piperidina en DMF (15:85, 2x 10 min), se realizaron ciclos repetidos de acoplamiento de aminoácidos y escisión de Fmoc hasta que se ensamblaron los péptidos dianas lineales. Para el acoplamiento de los aminoácidos se emplearon los reactivos siguientes: Fmoc-AA-OH (3,5 eq.), HOBt (1,0 eq.), DIC (3,5 eq.) en DMF durante 75 min. Para todos los aminoácidos se realizaron acoplamientos dobles. La biotina se acopló con el protocolo siguiente: Biotina (5,0 eq.), HBTU (5,0 eq.), DIPEA (10,0 eq.) en NMP durante 16 horas. Los péptidos se escindieron del soporte sólido con TFA/H₂O/TIPS/EDT (90:3:4:3, temperatura ambiente, 3 horas) y se trataron con MTBE a 0 °C. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante se eliminó para proporcionar los péptidos crudos. Para la ciclación, los péptidos se disolvieron en H₂O/MeCN a una concentración de 1 mg/mL. Las soluciones se llevaron a pH 7-7,5 por adición de 2 M amoníaco en H₂O. Después de la adición de DMSO (2 %) las soluciones se agitaron bajo una atmósfera de aire durante 16-72 horas. Después de la terminación de la ciclación, que se monitoreó por LC-MS, la mezcla de reacción cruda se acidificó con TFA y se liofilizó. La purificación se realizó por disolución en MeCN/H₂O y fraccionamiento por HPLC.

Ejemplo 2

Selección de péptidos específicos para IMAB362 mediante la presentación en fagos

Para la identificación de los péptidos de unión a IMAB362 se realizó la presentación en fagos mediante el uso de una biblioteca de fagos aleatoria restringida a disulfuro 7mer M13 (New England Biolabs). Para asegurar la buena accesibilidad del anticuerpo, se llevó a cabo una selección en protocolo de solución con captura con perlas de proteína A de los fagos de unión. Después de tres rondas consecutivas de tamizaje con rigor incrementado se pudo observar un enriquecimiento en los fagos específicos para la diana, medido por la dilución en placa de los fagos de entrada y salida y ELISA de fagos (datos no mostrados). El análisis de los clones individuales seleccionados al azar después de la tercera ronda de tamizaje produjo varias moléculas de unión a IMAB362 (Figura 1A). El ELISA de fagos sugiere que

los péptidos aislados son específicos para la parte variable de IMAB362, debido a que no se reconoció un anticuerpo control con cadena similar quimérico (Rituximab) y un fragmento Fc de IgG humana. El análisis de secuencia del ADN de los clones seleccionados reveló un motivo YPG común (Figura 1B) en el medio de las secuencias. Tres de las secuencias de péptidos (secuencia 1, 2, y 3; Figura 1B y Tabla 1) se seleccionaron para la unión y análisis SAR posterior y optimización a través de microarreglos de péptidos.

Tabla 1. Incubación del microarreglo de péptidos: resultados para la configuración del ensayo.				
Estructura del Péptido ^[a]	Concentración ^[b]	% Afinidad comparada con el péptido hallado		
		ACHLNYPGYCG (Sec.1)	ACHYSYPGVCG (Sec. 2)	ACHLGYPGRCG (Sec. 3)
Ciclopéptido-GGS-K(X)	1	100	100	100
X-Ttds-Ciclopéptido	1	95,9 (Péptido 1a)	98,3 (Péptido 2a)	107,8 (Péptido 3a)
X-Ttds-Ciclopéptido	0,1	2,6	22,9	11,6
X-Ttds-Péptido Lineal	1	0	0	0,1

Los resultados se muestran para nueve péptidos diferentes (las secuencias y estructuras se indican en la tabla). Las afinidades se calcularon de las unidades de fluorescencia como el porcentaje de la señal del ensayo de fluorescencia de los péptidos hallados que se identificaron por la presentación en fagos.

[a] X es el grupo funcional que se usó para la unión covalente de los péptidos al microarreglo.

[b] Concentración de IMAB362 (en µg/ml).

Análisis SAR y optimización de los péptidos específicos para IMAB362 por microarreglos de péptidos

Los microarreglos de péptidos se usaron para el análisis de la relación estructura y actividad (SAR) y la optimización de la afinidad de unión de los péptidos a IMAB362. Para la configuración del ensayo se prepararon tres variantes de cada péptido cíclico hallado (secuencias 1, 2 y 3, Tabla 1) que difieren en a) el sitio de inmovilización, b) la naturaleza del conector y c) el grado de restricción conformacional (cíclico vs. lineal). Todos los péptidos se sintetizaron químicamente de manera secuencial desde el C- al N-terminal mediante el enfoque de síntesis de SPOT de alto rendimiento [Wenschuh, H. y otros, Biopolymers 2000, 55, 188-206] mediante la aplicación de una membrana de celulosa como soporte sólido. Después de la escisión y aislamiento, los péptidos se ciclaron a través de la formación de disulfuros entre dos residuos de Cys internos e inmovilizados al microarreglo. La unión covalente al microarreglo se realizó a través de una fracción reactiva en el N- o C-terminal de los péptidos que permite la inmovilización quimiosselectiva y dirigida a través de ambos extremos de los péptidos. Posteriormente, los microarreglos cargados de péptidos se incubaron con 1,0 o 0,1 µg/ml de IMAB362 seguido por la incubación con 1 µg/ml de anticuerpo secundario marcado fluorescentemente, el escaneo y la evaluación de los datos.

Los resultados de las mediciones para la configuración del ensayo en los microarreglos de péptidos se muestran en la Tabla 1. El anticuerpo IMAB362 muestra unión fuerte de manera comparable a todos los péptidos parentales (cíclicos, inmovilizados a través del C-terminal) examinados (Tabla 1, fila 1). La unión fue independiente del sitio de inmovilización (inmovilización C- vs. N-terminal) (Tabla 1, fila 2). Como se esperaba, la reducción de la concentración de IMAB a 0,1 µg/ml (Tabla 1, fila 3) reduce la señal del ensayo. El experimento final (Tabla 1, fila 4) mostró que la ciclación es esencial para la unión debido a que ninguno de los péptidos lineales proporcionó ninguna señal en el ensayo de microarreglos.

Para la optimización de los péptidos, se realizaron análisis sustitutivos (intercambio de aminoácidos parentales en cada posición por todos los aminoácidos proteinogénicos excepto Cys) de los tres péptidos más prometedores (péptidos 1a, 2a y 3a, Tabla 1). En total 399 péptidos se sintetizaron, manipularon, ciclaron e inmovilizaron a microarreglos como se describió anteriormente. Los resultados después de la incubación de los microarreglos de péptidos con IMAB362 se muestran en la Figura 2. Se hace aparente que la sustitución de varios aminoácidos de las secuencias iniciales (secuencias número 1, 2 y 3) por aminoácidos alternativos resultó en el aumento de las intensidades de la señal. Varias secuencias que muestran las mayores intensidades de señal se seleccionaron para resíntesis, purificación y análisis de unión detallado (Figura 2, cuadros verdes).

Análisis de unión detallado de los péptidos específicos para IMAB362 optimizados

Los péptidos que presentaron las mayores afinidades de unión de los experimentos de microarreglo de péptidos se sintetizaron por protocolos estándar de síntesis en fase sólida basados en Fmoc y se purificaron (pureza del HPLC:

>80%). Se determinaron las características de unión de cada péptido. El ELISA se usó para la evaluación del comportamiento termodinámico, mientras que la interferometría de biocapa (BLI) se aplicó a los unidores más fuertes para el análisis cinético (ver también la Figura 5).

5 Los resultados de las mediciones que se muestran en la Tabla 2 indican que la afinidad de cada uno de los tres péptidos parentales (péptidos 1a, 2a y 3a) podrían mejorar significativamente. De manera correspondiente, los datos de BLI muestran las siguientes mejoras de la afinidad: péptido 1a (810 nM) a péptido 1c (108 nM), péptido 2a (100 nM) a péptido 2c (52 nM) y péptido 3a (320 nM) a péptido 3c (92 nM). En el ensayo de ELISA se midieron los valores de IC50 mejorados de manera considerable: péptido 1a (5,80 nM) a péptido 1c (0,26 nM), péptido 2a (4,44 nM) a péptido 2c (0,15 nM) y péptido 3a (1,61 nM) a péptido 3c (0,13 nM).

15

20

25

30

35

Tabla 2. Características de unión de los péptidos parentales y madurados.			
Péptido	Secuencia ^[a]	K _D aparente, ELISA ^[b] [nM]	K _D aparente, BLI ^[c] [nM]
1a	Biotina-Ttds-ACHLNYPGYCG-OH	5,80	810
1b.	Biotina-Ttds-ACHLNYPGWCG-OH	0,28	n.d.
1c	Biotina-Ttds-ACHLGYPGYCG-OH	0,26	108
2a	Biotina-Ttds-ACHYSYPGVCG-OH	4,44	100
2b	Biotina-Ttds-ACHYSYPGWCG-OH	2,12	n.d.
2c	Biotina-Ttds-ACHYGYPGVCG-OH	0,15	52
3a	Biotina-Ttds-ACHLGYPGRCG-OH	1,61	320
3b	Biotina-Ttds-ACHYGYPGRCG-OH	0,57	n.d.
3c	Biotina-Ttds-ACHLGYPGWCG-OH	0,13	92

Se muestran las constantes de unión aparente para los péptidos de unión a IMAB362 parentales y madurados.

[a]Todos los péptidos se ciclaron mediante la formación del enlace disulfuro Cys-Cys. Ttds es un conector con la estructura siguiente: 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecano- ácido succinámico. Los aminoácidos que se intercambiaron en comparación con la secuencia original se subrayan. [b]Los valores mostrados son la media de al menos dos mediciones individuales. [c]Medición de al menos seis concentraciones diferentes de IMAB362 durante un período de tiempo de cada 1200 seg para asociación y disociación. n.d. = no determinado.

40 Para el desarrollo de un sistema de detección óptimo para IMAB362 en muestras biológicas se eligió el grupo de péptidos 2 (péptidos 2a, 2b y 2c, Tabla 2) para el análisis de ELISA de péptidos detallado, debido a que el péptido 2ces la variante más afín cuando se consideran los datos de BLI y ELISA. Para este propósito, los péptidos se inmovilizaron en placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina y se midió por ELISA la unión de IMAB362 y un anticuerpo control similar. La Figura 3A muestra las curvas de unión de los tres péptidos en comparación. Para simular las situaciones de un estudio farmacocinético el péptido más afín 2c también se analizó en la presencia de hasta 20 % de suero humano o murino (Figura 3B y 3C). Se hizo evidente que la unión de IMAB362 al péptido 2c casi no se afecta por los componentes de suero de ratón. Las curvas de unión lucen similares cuando el anticuerpo se diluyó con suero de humano aunque la señal de fondo incrementó ligeramente especialmente a concentraciones altas de suero.

50 Uso de los péptidos específicos para IMAB362 para la detección de IMAB362 en muestras de suero de un estudio farmacocinético

Para probar la aplicabilidad del ensayo desarrollado se llevó a cabo un estudio farmacocinético. Para este propósito, IMAB362 (aproximadamente 50 mg/kg en tampón PBS), Rituximab (aproximadamente 50 mg/kg en tampón PBS) o tampón PBS se inyectaron en ratones Balb-cJ. Se tomaron muestras sanguíneas después de diferentes puntos de tiempos (8, 24, 48, 72, 144 y 192 hrs) y posteriormente se analizaron por ELISA de péptidos mediante el uso del péptido mimótopo 2c para la captura del anticuerpo. La Figura 4 muestra una disminución de la concentración de IMAB362 en los ratones a lo largo del tiempo que inicia de aproximadamente 800 µg/ml después de 8 horas a aproximadamente 350 µg/ml al final del estudio. Todas las muestras control de los grupos de ratones Rituximab y PBS fueron negativas, lo que ilustra la alta especificidad del ensayo desarrollado.

Ejemplo 3 Influencia del mimótopo de CLDN18.2 en la unión de BiMAB a células dianas NucC4 y en la lisis de la célula diana NucC4

65 Cultivo de células

La línea celular humana de cáncer gástrico NugC4 se derivó de la Japanese Collection of Research Bioresources y se ha transducido establemente con el gen humano de CLDN18.2 en adición a una transfección estable con el gen de la luciferasa de luciérnaga. Las células se cultivaron en medio completo RPMI que contiene FBS al 10 % a 37 °C en una incubadora humedecida con CO2 al 7,5 %.

5 Preparación de células T humanas primarias

Las células T humanas se aislaron recientemente de sangre humana de donantes saludables de acuerdo con los procedimientos estándar (Current Protocols in Immunology, 2012): rápidamente, la sangre se diluyó con DPBS, se separó en Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences) y se centrifugó. Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) se colectaron de la interfase, se lavaron con DPBS frío suplementado con 2 mM de EDTA y se contaron. Las células T humanas se separaron posteriormente por separación magnética células activadas (MACS) de las PBMC mediante el Kit II Pan T-Cell Isolation (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la lisis mediada por BiMAB de las células dianas NugC4 que expresan CLDN18.2 por las células T humanas primarias, se realizó un ensayo de citotoxicidad basado en luminiscencia. Las células T humanas se prepararon como se describió anteriormente. Se usaron las células NugC4 estables que expresan el gen de la luciferasa como células dianas. Se sembraron 1x10⁴ células dianas por pocillo en placas blancas de 96 pocillos de fondo plano. Las células T humanas se añadieron en una relación E:T de 5:1. Se usó medio completo RPMI + FBS al 10 % para ajustar el volumen final a 100 µl. Las muestras prueba y muestras control se depositaron al menos en triplicados.

20 Las microplacas de cultivo celular se incubaron durante 24 h a 37 °C, CO2 al 5 %. Después, 50 µl de una solución acuosa que contiene 1 mg/ml de luciferina (BD Monolight, BD Biosciences) y 50 mM de HEPES se añadieron por pocillo y las placas se incubaron posteriormente durante 30 min en la oscuridad a 37 °C. La luminiscencia que surge de la oxidación de la luciferina por la luciferasa que expresan las células viables se midió en un lector de microplacas (Infinite M200, Tecan). El porcentaje de la lisis específica de células diana se calculó mediante la siguiente fórmula: % lisis específica = $[1 - (\text{luminiscencia de la muestra prueba} - L_{\text{max}}) / (L_{\text{min}} - L_{\text{max}})] \times 100$, donde "L" indica lisis. Lmin se refiere a la lisis mínima en la ausencia de bi-scFv y Lmax a la lisis máxima (igual a los conteos de luminiscencia espontánea) en la ausencia de bi-scFv alcanzado mediante la adición de Tritón X-100 (concentración final 2 %).

Ensayo de unión celular

35 Para evaluar la unión a células dianas cancerosas de un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico específico para CLDN18.2 en las células dianas cancerosas, se incubaron 2x10⁵ células NugC4 durante 30 min con 100, 1000 o 10000 ng/ml de BiMAB en un volumen final de 100 µl a 4 °C. Después, las células se lavaron con 2 ml de DPBS seguido por la tinción con 3,3 µg/ml de un anticuerpo anti-His (Dianova) durante otros 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron de nuevo con 2 ml de DPBS y se tiñeron con un anticuerpo anti-ratón conjugado a alofococianina (BD Biosciences) durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con 2 ml de DPBS antes de medir la intensidad media de la fluorescencia en FACS canto II (Becton Dickinson).

45 La Figura 6 muestra la influencia del mimótopo CLDN18.2 en la unión de BiMAB a células dianas NugC4 y en la lisis de células diana NugC4.

Listado de secuencias

<110> BioNTech AG y otros

50 <120> Mimótopos peptídicos de claudina 18.2 y sus usos

<130> 674-121

<160> 75

55 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 261

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

65

ES 2 699 753 T3

1 Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 5
 5 Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 10 Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 15 Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 20 Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 25 Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 30 Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser
 35 Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser
 40
 45
 50
 55
 60
 65 Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val

ES 2 699 753 T3

	130		135		140														
5	Thr	Asn	Phe	Trp	Met	Ser	Thr	Ala	Asn	Met	Tyr	Thr	Gly	Met	Gly	Gly			
	145					150					155					160			
10	Met	Val	Gln	Thr	Val	Gln	Thr	Arg	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ala	Leu	Phe			
					165					170					175				
15	Val	Gly	Trp	Val	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr	Leu	Ile	Gly	Gly	Val	Met	Met			
				180					185					190					
20	Cys	Ile	Ala	Cys	Arg	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Glu	Thr	Asn	Tyr	Lys	Ala			
			195					200					205						
25	Val	Ser	Tyr	His	Ala	Ser	Gly	His	Ser	Val	Ala	Tyr	Lys	Pro	Gly	Gly			
		210					215					220							
30	Phe	Lys	Ala	Ser	Thr	Gly	Phe	Gly	Ser	Asn	Thr	Lys	Asn	Lys	Lys	Ile			
	225					230					235					240			
35	Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Val	Gln	Ser	Tyr	Pro	Ser			
					245					250					255				
40	Lys	His	Asp	Tyr	Val														
				260															
45	<210>	2																	
	<211>	118																	
50	<212>	PRT																	
	<213>	Secuencia artificial																	
55	<220>																		
	<223>	Fragmento de anticuerpo																	
60	<400>	2																	
65	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ala			
	1				5					10					15				
70	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr			
				20					25					30					

ES 2 699 753 T3

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 5
 Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 10
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 15
 Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20
 Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 25
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 30
 <210> 3
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Fragmento de anticuerpo
 40
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 45
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 50
 Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 55
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 60
 65
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

ES 2 699 753 T3

<223> Conector
<400> 7

5 Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

10 <210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Conector
<400> 8

20 Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

25 Val Asp

30 <210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Conector
<400> 9

40 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

45 Gly Gly Gly Ser
20 -

50 <210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Conector
<400> 10

60 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

65 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

ES 2 699 753 T3

<210> 11
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Conector

<400> 11

10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

15

Gly Ser

<210> 12
<211> 467
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

25

<400> 12

30

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 699 753 T3

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 5
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 10
 Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 15
 Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 20
 Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 25
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 30
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 35
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 40
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 45
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 50
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 55
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 60
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 65

ES 2 699 753 T3

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 5
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 10
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 15
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 20
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 25
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 30
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 35
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 40
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 45
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 50
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 55
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 60
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 65
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 70
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 75
 Pro Gly Lys
 465

ES 2 699 753 T3

<210> 13
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 13

10

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
 1 5 10 15

15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
 20 25 30

20

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

25

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
 50 55 60

30

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 65 70 75 80

35

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 85 90 95

40

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
 100 105 110

45

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr

50

55

60

65

ES 2 699 753 T3

		115					120					125					
5		Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe
		130						135					140				
10		Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys
		145					150					155					160
15		Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val
					165						170					175	
20		Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln
					180					185					190		
25		Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser
				195					200					205			
30		Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His
		210						215					220				
35		Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
		225					230					235					240

- 35 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Secuencia consenso
- 45 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (1)..(1)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His y Tyr
- 50 <220>
 <221> caract._misceláneas
 < 222> (2)..(2)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys y Tyr
- 55 <220>
 <221> caract._misceláneas
 < 222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg y Ser
- 60 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Pro

- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (6)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Gly, Lys y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Gly
- 5
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (7) .. (7)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg y Val
- 10
- <400> 14
- 15
- | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Xaa | Tyr | Xaa | Xaa | Xaa |
| 1 | | | 5 | | | |
- <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20
- <220>
 <223> Secuencia consenso
- 25
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (2)..(2)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His y Tyr
- 30
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys y Tyr
- 35
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg y Ser
- 40
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (6)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Pro
- 45
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Gly, Lys y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Gly
- 50
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg y Val
- 55
- <400> 15
- 60
- 65

ES 2 699 753 T3

Cys Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Cys
 1 5

- 5 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Secuencia consenso
- <220>
 <221> caract._misceláneas
- 15 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His y Tyr
- <220>
 <221> caract._misceláneas
- 20 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys y Tyr
- 25 <220>
 <221> caract._misceláneas
- <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg y Ser
- 30 <220>
 <221> caract._misceláneas
- <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Pro
- <220>
 <221> caract._misceláneas
- 40 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Gly, Lys y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Gly
- <220>
 <221> caract._misceláneas
- 45 <222> (9)..(9)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg y Val
- 50 <400> 16

Ala Cys Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Cys

- 55 1 5 10 -
- <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 65 <223> Secuencia consenso

- 5 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His y Tyr
- 10 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys y Tyr
- 15 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg y Ser
- 20 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Pro y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Tyr y Pro
- 25 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His, Gly, Lys y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Gly
- 30 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (9)..(9)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg y Val
- 35 <400> 17
- 40
- | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Xaa | Xaa | Xaa | Tyr | Xaa | Xaa | Xaa | Cys | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- 45 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Secuencia consenso
- 55 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (1)..(1)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr
- 60 <220>
 <221> caract._misceláneas
 < 222> (2)..(2)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr y Phe
- 65 <220>
 <221> caract._misceláneas

< 222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys

5

<220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys

10

<400> 18

15

Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Pro	Gly	Xaa
1				5		

<210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Secuencia consenso

25

<220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (2)..(2)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr

30

<220>
 <221> caract._misceláneas
 < 222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr y Phe

35

<220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys

40

<220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys

45

<220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys

50

<400> 19

55

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Pro	Gly	Xaa	Cys
1					5			

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Secuencia consenso

<220>
 <221> caract._misceláneas
 < 222> (3)..(3)

65

ES 2 699 753 T3

- <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gin, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr
- <220>
 5 <221> caract._misceláneas
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr y Phe
- 10 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys
- 15 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (9)..(9)
 20 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys
- <400> 20
- 25
- | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Xaa | Xaa | Xaa | Tyr | Pro | Gly | Xaa | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |
- 30 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Secuencia consenso
- <220>
 <221> caract._misceláneas
 40 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln, His, Tyr, Lys y Met, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr
- <220>
 45 <221> caract._misceláneas
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Leu, Lys, Tyr, Phe y Arg, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr y Phe
- 50 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Gly, Asn, Arg, Ser, Lys, Trp, Phe y Tyr, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys
- 55 <220>
 <221> caract._misceláneas
 <222> (9)..(9)
 60 <223> Cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe y Lys
- <400> 21
- 65
- | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Cys | Xaa | Xaa | Xaa | Tyr | Pro | Gly | Xaa | Cys | Gly |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |

ES 2 699 753 T3

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Mimótopo peptídico
10
<400> 22
Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr
1 5
15
<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
20
<220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 23
25
His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg
1 5
30
<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35
<220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 24
40
His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg
1 5
45
<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 25
55
His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp
1 5
60
<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
65
<220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 26

ES 2 699 753 T3

His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val
1 5

5 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 27

15 His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val
1 5

20 <210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 28

30 His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp
1 5

35 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 29

45 His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu
1 5

50 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 30

60 His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu
1 5

65 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 699 753 T3

<223> Mimótopo peptídico
<400> 31
5 His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr
1 5

<210> 32
10 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Mimótopo peptídico
<400> 32

20 His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr
1 5

<210> 33
25 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Mimótopo peptídico
<400> 33

35 His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp
1 5

<210> 34
40 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Mimótopo peptídico
<400> 34

50 Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr
1 5

<210> 35
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Mimótopo peptídico
60 <400> 35

65 His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp
1 5

<210> 36

ES 2 699 753 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 36
 10 Cys Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr Cys
 1 5
 <210> 37
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 37
 25 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg Cys
 1 5
 <210> 38
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 38
 40 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg Cys
 1 5
 <210> 39
 45 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 50 <400> 39
 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp Cys
 1 5
 55 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 40
 65

ES 2 699 753 T3

Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val Cys
1 5

5 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 41

15 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val Cys
1 5

20 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 42

30 Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp Cys
1 5

35 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 43

45 Cys His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu Cys
1 5

50 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 44

60 Cys His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu Cys
1 5

65 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 699 753 T3

<220>
<223> Mimótopo peptídico

5 <400> 45

Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr Cys
1 5

10 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 46

20 Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys
1 5

25 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 47

35 Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp Cys
1 5

40 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 48

50 Cys Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys
1 5

55 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Mimótopo peptídico

<400> 49

65 Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp Cys
1 5

<210> 50

ES 2 699 753 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 50

10 Ala Cys Gln Pro Ala Tyr Tyr His Thr Cys Gly
 1 5 10

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 51

20 Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg Cys Gly
 1 5 10

25 <210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 52

35 Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg Cys Gly
 1 5 10

40 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 53

50 Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp Cys Gly
 1 5 10

55 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 54

65

ES 2 699 753 T3

Ala Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val Cys Gly
1 5 10

5 <210> 55
< 211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 55

Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val Cys Gly
1 5 10

20 <210> 56
< 211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 56

Ala Cys His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp Cys Gly
1 5 10

35 <210> 57
< 211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 57

Ala Cys His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu Cys Gly
1 5 10

50 <210> 58
< 211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Mimótopo peptídico
<400> 58

Ala Cys His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu Cys Gly
1 5 10

60 <210> 59
< 211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Mimótopo peptídico

ES 2 699 753 T3

400> 59

Ala Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly
 1 5 10

5

<210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Mimótopo peptídico

15

<400> 60

Ala Cys His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly
 1 5 10

20

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Mimótopo peptídico

30

<400> 61

Ala Cys His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp Cys Gly
 1 5 10

35

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 62

45

Ala Cys Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr Cys Gly
 1 5 10

50

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Mimótopo peptídico

<400> 63

60

Ala Cys His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp Cys Gly
 1 5 10

65

<210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 753 T3

<220>
<223> Mimótopo peptídico

5 <400> 64

Tyr Leu His Pro Asp
1 5

10 <210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Mimótopo peptídico

20 <400> 65

Thr Pro Tyr His His Pro Asp Phe Pro Tyr Trp Phe
1 5 10

25 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Mimótopo peptídico

35 <400> 66

Tyr Leu His Pro Asp Tyr Pro
1 5

40 <210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Mimótopo peptídico

50 <400> 67

Tyr Leu His Pro Asp Val Met
1 5

55 <210> 68
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Mimótopo peptídico

65 <400> 68

ES 2 699 753 T3

1 Pro Arg Cys Lys Ser Glu Gly Pro His His Pro Asp Tyr Pro Asp Cys
 1 5 10 15
 5 Arg Arg Asp Ser Asp Cys Asn Gly Glu Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
 20 25 30
 10 Tyr Cys Gly
 35
 <210> 69
 < 211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 20 <400> 69
 25 Ala Cys Arg His Pro Asp His Leu Asp Cys
 1 5 10
 <210> 70
 < 211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 70
 35 Ala Cys His Glu Thr His His Pro Asp Cys
 1 5 10
 40 <210> 71
 < 211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 71
 50 Ser Phe Arg Asp Met Asn Tyr Ser Asp Tyr Phe Met
 1 5 10
 55 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 72
 65 His Ile Leu Pro Leu Tyr Pro
 1 5

ES 2 699 753 T3

<210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 73
 10
 Ser Pro Tyr Met Pro Met Gln
 1 5
 15
 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 <400> 74
 25
 Asp Arg Cys Trp Leu Glu Gln Trp Pro Cys Arg Arg Asp Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 30
 Pro
 <210> 75
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Mimótopo peptídico
 40
 <400> 75
 45
 Gln Thr Cys Asp His Asp Thr Arg His Pro Thr Gly Asp Asp Leu Cys
 1 5 10 15
 50
 Arg Arg Asp Ser Asp Cys Gly Gly Asn Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
 20 25 30
 55
 Tyr Cys Gly
 35

Reivindicaciones

1. Un mimótopo peptídico de claudina 18.2 (CLDN18.2) que comprende la secuencia de aminoácidos Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Met, His y Tyr, Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys y
Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val, en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.

2. Uso de un mimótopo peptídico para detectar la unión de un agente de unión a un epítipo en el dominio extracelular de claudina 18.2 (CLDN18.2), en donde
(a) el agente de unión comprende un dominio de unión que comprende una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina con una especificidad para CLDN18.2 (VH) y una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para CLDN18.2 (VL), dicha VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 2 y dicha VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 3 y
(b) el mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val, en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la secuencia del mimótopo peptídico de acuerdo con Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
His Leu Gly Tyr Pro Gly Arg,
His Tyr Gly Tyr Pro Gly Arg,
His Leu Gly Tyr Pro Gly Trp,
His Tyr Ser Tyr Pro Gly Val,
His Tyr Gly Tyr Pro Gly Val,
His Tyr Ser Tyr Pro Gly Trp,
His Leu Arg Tyr Pro Gly Glu,
His Tyr Arg Tyr Pro Gly Glu,
His Leu Asn Tyr Pro Gly Tyr,
His Leu Gly Tyr Pro Gly Tyr,
His Leu Asn Tyr Pro Gly Trp,
Tyr Lys Gly Tyr Pro Gly Tyr, y
His Tyr Gly Tyr Pro Gly Trp.

4. El uso de la reivindicación 2 o 3, en donde el mimótopo peptídico se conjuga a al menos una pareja de fusión.

5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el mimótopo peptídico es parte de un polipéptido de fusión.

6. El uso de la reivindicación 4 o 5, en donde la pareja de fusión comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga.

7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la pareja de fusión comprende un reportero para un ensayo inmunológico, en donde el reportero preferentemente se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, o una molécula fluorescente.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la pareja de fusión comprende una etiqueta.

9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde el agente de unión a CLDN18.2 se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para CLDN18.2, una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un dominio de unión a CLDN18.2 y un receptor de antígeno quimérico (CAR).

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en donde la unión es una unión específica.
11. Un ácido nucleico recombinante que codifica un mimótopo peptídico de la reivindicación 1.
- 5 12. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 11 que está en la forma de un vector o en la forma de ARN.
13. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante de la reivindicación 11 o 12.
- 10 14. Un método para evaluar la presencia y/o cantidad de CLDN18.2 en una muestra que comprende el uso de un mimótopo peptídico, en donde dicho mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos
Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia
15 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val,
20 en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.
15. El método de la reivindicación 14, en donde el mimótopo peptídico se conjuga a una etiqueta o a un reportero.
- 25 16. Un método para evaluar la presencia y/o cantidad de agentes de unión a CLDN18.2 tales como anticuerpos CLDN18.2 en una muestra que comprende el uso de un mimótopo peptídico, en donde dicho mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos
Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
30 Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
35 Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val,
en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.
- 40 17. Un método para capturar los agentes de unión a CLDN18.2 tales como anticuerpos CLDN18.2 anticuerpos en una muestra mediante el uso de un mimótopo peptídico, en donde dicho mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos
Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
45 Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
50 Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val,
en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.
18. El método de la reivindicación 16 o 17 que se realiza en el contexto de un inmunoensayo.
- 55 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el mimótopo peptídico es inmovilizado de manera liberable o no liberable en un soporte sólido.
- 60 20. Un método de purificar un agente de unión a CLDN18.2, que comprende tratar una muestra que comprende el agente de unión a CLDN18.2 con un mimótopo peptídico inmovilizado, una etapa de lavado para separar los compuestos no deseados tales como impurezas, y una etapa de elución para obtener el agente de unión a CLDN18.2, en donde dicho mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos
Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
en donde
Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
65 Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,

- Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
 Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val,
 5 en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.
21. Un mimótopo peptídico para su uso en un método para tratar un sujeto expuesto a un agente de unión a CLDN18.2, dicho método que comprende tratar el organismo con dicho mimótopo peptídico, en donde el dominio de unión de dicho agente de unión comprende una región variable de la cadena pesada de una
 10 inmunoglobulina con una especificidad para CLDN18.2 (VH) y una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina con una especificidad para CLDN18.2 (VL), dicha VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 2 y dicha VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 3, y en donde dicho mimótopo peptídico comprende la secuencia de aminoácidos
 15 Cys Xaa1 Xaa2 Xaa3 Tyr Pro Gly Xaa4 Cys
 en donde
 Xaa1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en His y Tyr,
 Xaa2 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys, Tyr, Arg y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Lys y Tyr,
 20 Xaa3 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg, Ser, Trp y Lys, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly, Asn, Arg y Ser, y
 Xaa4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg, Val, Lys, Ile, Met y Phe, con mayor preferencia un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Trp, Tyr, Glu, Arg y Val,
 25 en donde los grupos tiol de dichos residuos de cisteína forman puentes disulfuros intramoleculares.
22. El mimótopo peptídico para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el mimótopo peptídico es antagonista al agente de unión a CLDN18.2 o neutraliza la unión del agente de unión a CLDN18.2 a CLDN18.2.
- 30 23. El mimótopo peptídico de la reivindicación 1, el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 11 o 12 o la célula huésped de la reivindicación 13 para su uso en la terapia, en particular para su uso en tratar o prevenir el cáncer en un paciente.

Figura 1

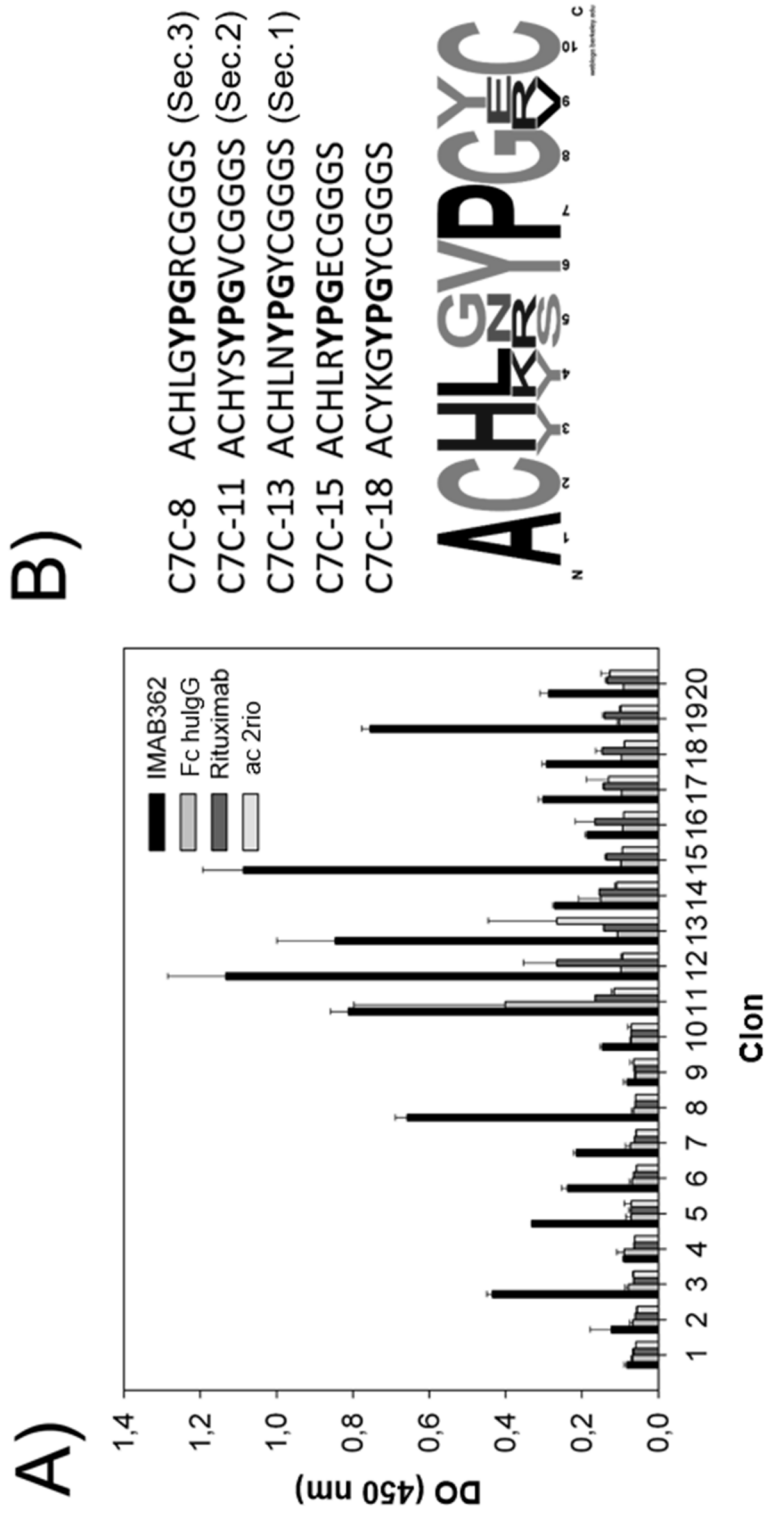


Figura 2

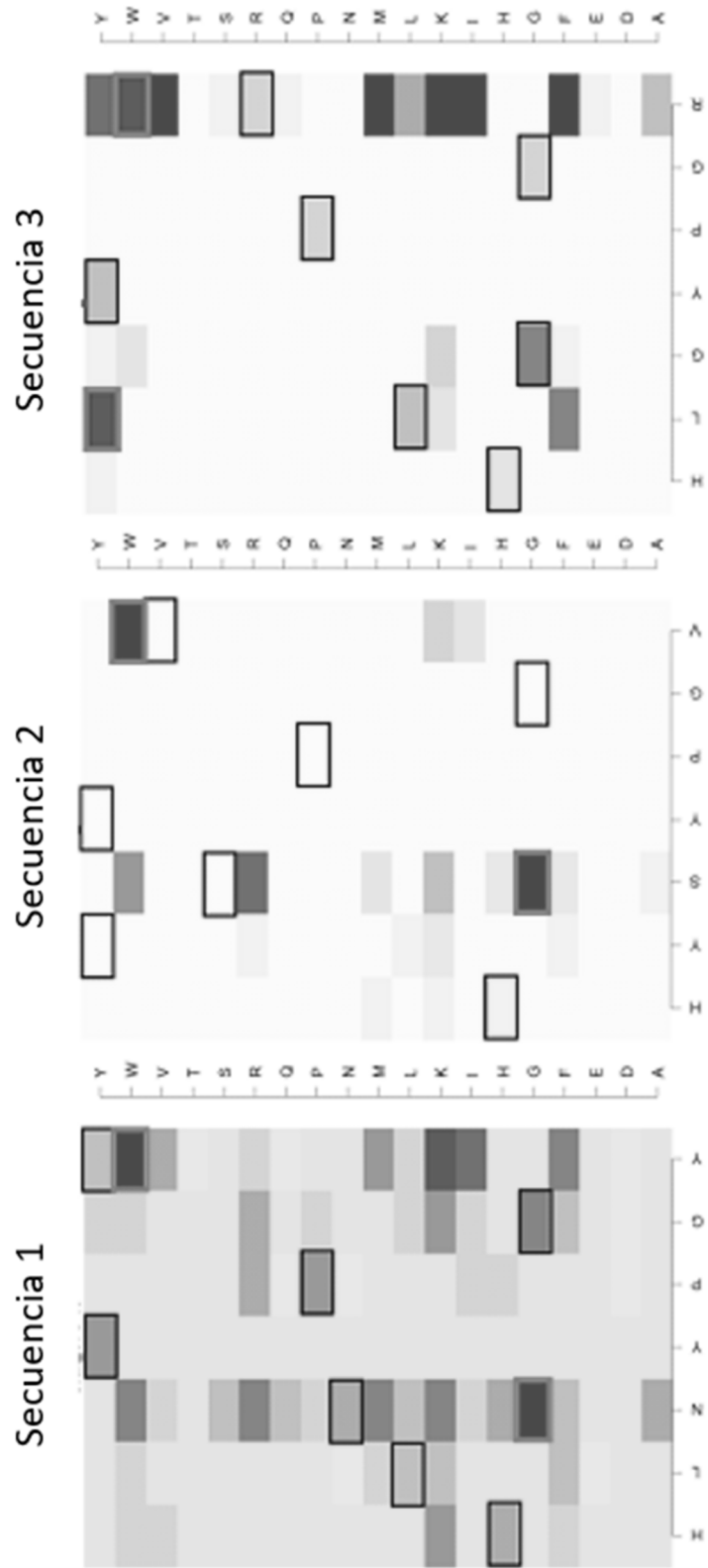
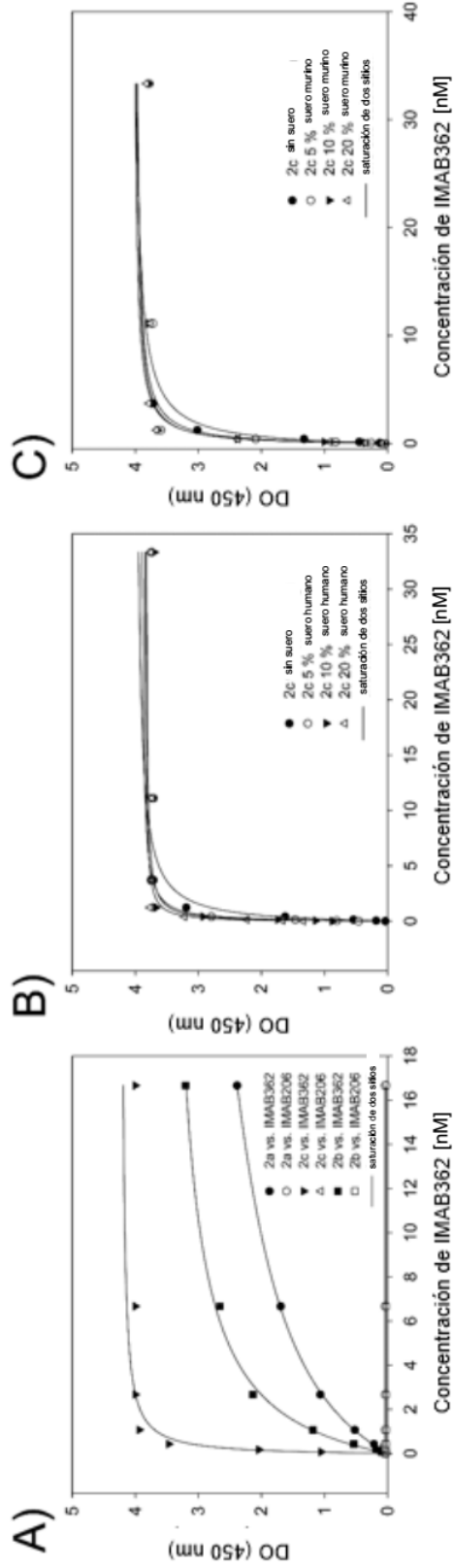


Figura 3



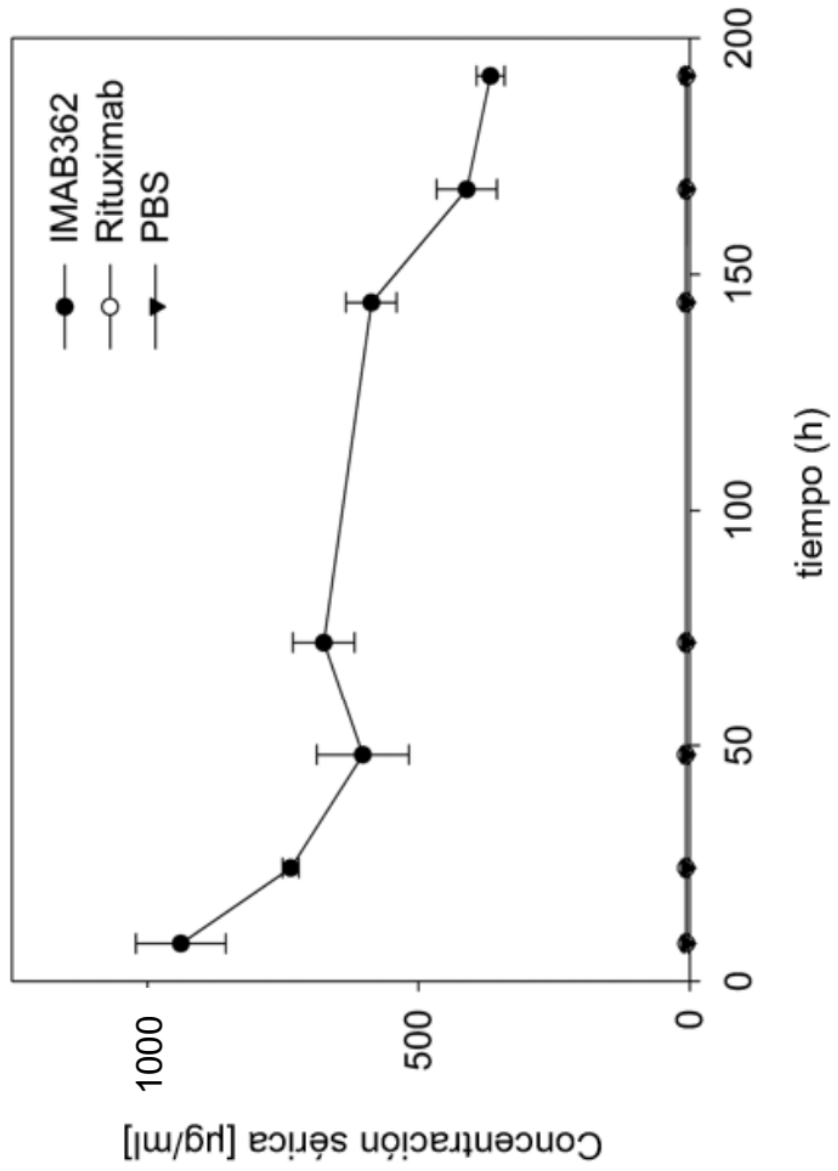


Figura 4

Figura 5

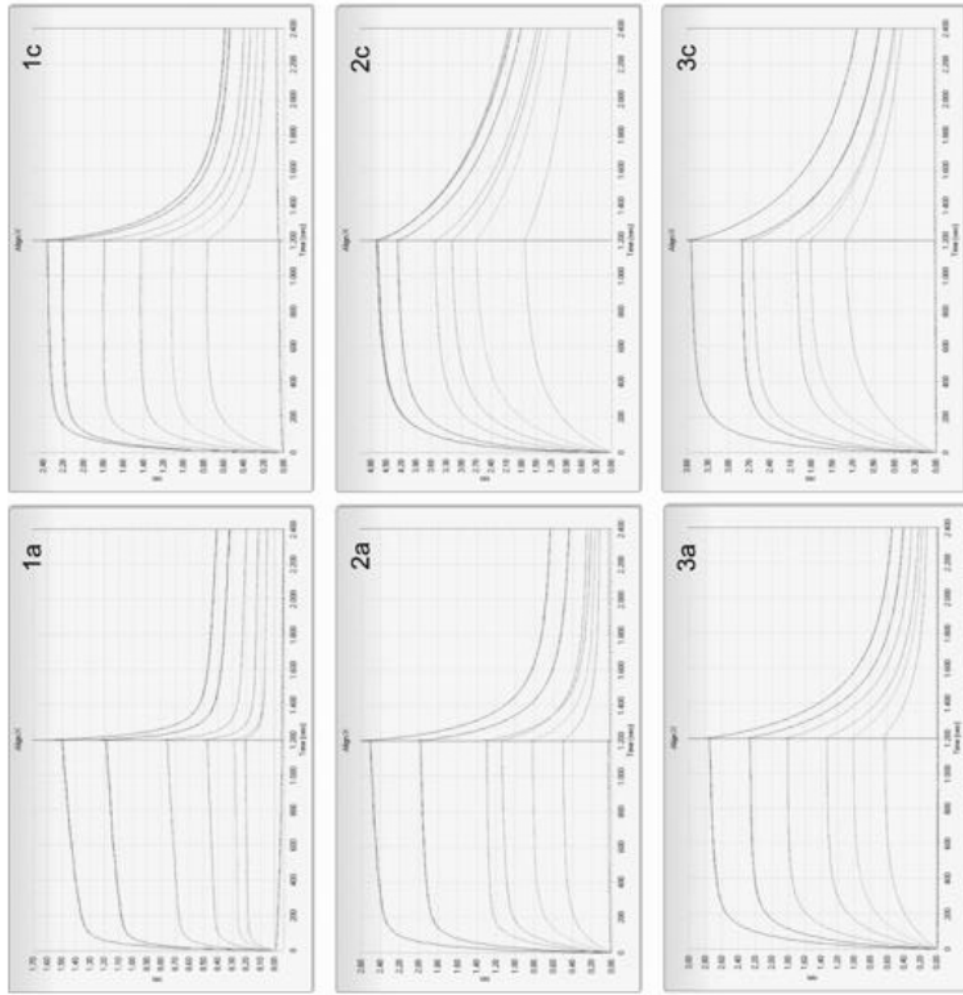


Figura 6

A

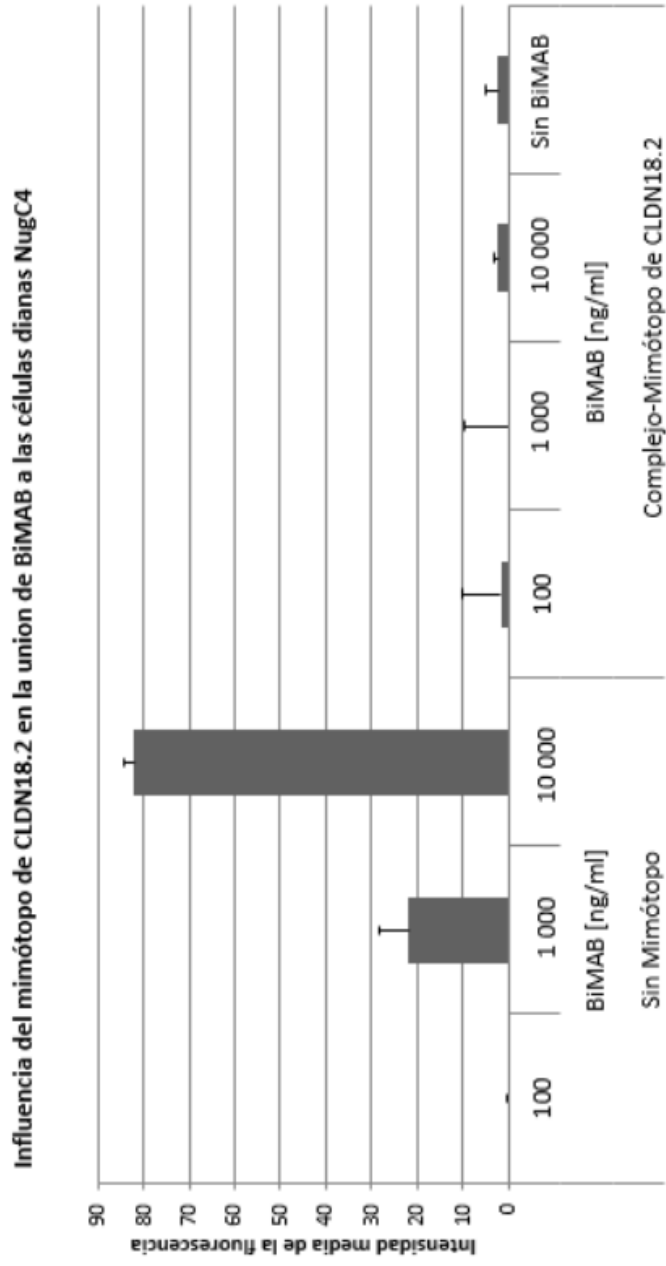


Figura 6

