

PROTEÍNAS QUE SE UNEN A NKG2D, CD16 Y FLT3

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio y prioridad de la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 62/539,421, presentada el 31 de julio de 2017, cuyo contenido se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia para todos los fines.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias presentado en forma electrónica en formato ASCII e incorporado a la presente mediante referencia en su totalidad. Dicha copia de ASCII, creada el 30 de julio de 2018, se denomina DFY-027WO_SL.txt y tiene un tamaño de 103,731 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a proteínas de unión multiespecífica que se unen a NKG2D, CD16, y a un antígeno asociado a tumores FLT3.

ANTECEDENTES

El cáncer continúa siendo un problema de salud significativo a pesar de los esfuerzos de investigación sustanciales y avances científicos informados en la literatura para tratar esta enfermedad. El cáncer hematológico y de médula ósea son tipos de cáncer frecuentemente diagnosticados, que incluyen mielomas múltiples, leucemia y linfomas. Las opciones de tratamiento actuales para estos cánceres no son eficaces para todos los pacientes y/o pueden tener efectos secundarios adversos sustanciales. Otros tipos de cáncer aún son difíciles de tratar mediante el uso de opciones terapéuticas existentes.

Las inmunoterapias para el cáncer son deseables dado que son altamente específicas y pueden facilitar la destrucción de células cancerosas mediante el uso del propio sistema inmunitario del paciente. Las proteínas de fusión tales como enlazadores de células T biespecíficos son inmunoterapias para el cáncer descritas en la literatura que se unen a células tumorales y células T para facilitar la destrucción de células tumorales. Se ha descrito en la literatura anticuerpos que se unen a determinados antígenos asociados a tumores y a determinadas células inmunes. Véase, *por ejemplo*, WO 2016/134371 y WO 2015/095412.

Las células asesinas naturales (NK) son un componente del sistema inmunitario innato y constituyen

aproximadamente 15 % de los linfocitos circulantes. Las células NK se infiltran virtualmente en todos los tejidos y se caracterizaron originalmente por su capacidad de matar células tumorales de forma eficaz sin la necesidad de previa sensibilización. Las células NK activadas matan las células diana mediante medios similares a las células T citotóxicas, es decir, mediante gránulos citolíticos que contienen perforina y granzimas así como a través de vías del receptor de muerte. Las células NK activadas también segregan citocinas inflamatorias tales como IFN- γ y quimiocinas que promueven el reclutamiento de otros leucocitos hacia el tejido diana.

Las células NK responden a señales a través de una variedad de receptores inhibidores y de activación sobre su superficie. Por ejemplo, cuando las células NK se encuentran con autocélulas sanas, su actividad es inhibida a través de la activación de los receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR). De manera alternativa, cuando las células NK se encuentran con células extrañas o células cancerosas, se activan a través de sus receptores de activación (por ejemplo, NKG2D, NCR, DNAM1). Las células NK también se activan por la región constante de algunas inmunoglobulinas a través de los receptores de CD16 sobre su superficie. La sensibilidad general de las células NK a la activación depende de la suma de señales estimuladoras e inhibidoras.

La tirosina quinasa-3 similar a FMS (FLT3), un receptor tirosina quinasa expresado en progenitores multipotentes y progenitores linfoides comunes, es importante para el desarrollo de los sistemas hematopoyético e inmunitario. La señalización a través de FLT3 juega un rol importante en la supervivencia celular, proliferación y diferenciación. Las mutaciones del receptor de FLT3 pueden conducir al desarrollo de leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia de células T, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica y leucemia de células pilosas. Las duplicaciones en tándem internas de FLT3 (FLT3-ITD) son las mutaciones más comunes asociadas con la leucemia mielógena aguda (AML).

COMPENDIO

La invención proporciona proteínas de unión multiespecífica que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 sobre células asesinas naturales, y un antígeno asociado a tumores FLT3. Dichas proteínas se pueden acoplar a más de un tipo de receptor de activación de NK y pueden bloquear la unión de ligandos naturales al NKG2D. En determinadas modalidades, las proteínas pueden ser agonistas de células NK en humanos. En algunas modalidades, las proteínas pueden ser agonistas de células NK en humanos y en otras especies tales como roedores y monos cynomolgus. A continuación, se describen más detalladamente diversos aspectos y modalidades de la invención.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona una proteína que incorpora un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado a tumores FLT3; y un dominio Fc de anticuerpo, una parte de esta suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16.

Cada uno de los sitios de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo y un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (por ejemplo, dispuesto como en un anticuerpo o fusionados entre sí para formar un scFv) o uno o más de los sitios de unión al antígeno pueden ser un anticuerpo de dominio único, tal como un anticuerpo V_HH similar a un anticuerpo de camélido o un anticuerpo V_{nar} similar a los que se encuentran en peces cartilaginosos.

En un aspecto, la presente invención proporciona proteínas de unión multiespecífica que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 sobre células asesinas naturales, y un antígeno asociado a tumores FLT3. El sitio de unión a NKG2D incluye un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a una secuencia de aminoácidos que se selecciona de: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:85, y SEQ ID NO:93.

El primer sitio de unión al antígeno, que se une a NKG2D, en algunas modalidades, puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO: 1, tal como al tener una secuencia de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO:1, y/o que incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO: 105), CDR2 (SEQ ID NO: 106) y CDR3 (SEQ ID NO: 107), de la SEQ ID NO: 1. El dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO: 1 puede acoplarse con una variedad de dominios variables de cadena ligera para formar un sitio de unión a NKG2D. Por ejemplo, el primer sitio de unión al antígeno que incorpora un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO: 1 puede incorporar además un dominio variable de cadena ligera seleccionado de cualquiera de las secuencias relacionadas con las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, y 40. Por ejemplo, el primer sitio de unión al antígeno incorpora un dominio variable de cadena pesada con secuencias de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO: 1 y un dominio variable de cadena ligera con secuencias de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96

%, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idénticas a cualquiera de las secuencias que se seleccionan de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, y 40.

De manera alternativa, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:41 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 42. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:41 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:43), CDR2 (SEQ ID NO:44) y CDR3 (SEQ ID NO:45) de la SEQ ID NO:41. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:42 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:46), CDR2 (SEQ ID NO:47), y CDR3 (SEQ ID NO:48) de la SEQ ID NO:42.

En otras modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:49 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:50. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:49 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:51), CDR2 (SEQ ID NO:52) y CDR3 (SEQ ID NO:53) de la SEQ ID NO:49. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:50 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:54), CDR2 (SEQ ID NO:55) y CDR3 (SEQ ID NO:56) de la SEQ ID NO:50.

De manera alternativa, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:57 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 58, tal como al tener secuencia de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO:57 y al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO:58, respectivamente.

En otra modalidad, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:59 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:60. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:59 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO: 134), CDR2 (SEQ ID NO: 135) y CDR3 (SEQ ID NO: 136), de la SEQ ID NO:59. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:60 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO: 137), CDR2 (SEQ ID NO: 138) y CDR3 (SEQ ID NO: 139), de la SEQ ID NO:60.

El primer sitio de unión al antígeno, que se une a NKG2D, en algunas modalidades, puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:61 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 62. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:61 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64) y CDR3 (SEQ ID NO:65) de la SEQ ID NO:61. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:62 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:66), CDR2 (SEQ ID NO:67) y CDR3 (SEQ ID NO:68) de la SEQ ID NO:62. En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:69 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 70. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:69 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:72) y CDR3 (SEQ ID NO:73) de la SEQ ID NO:69. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:70 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:74), CDR2 (SEQ ID NO:75) y CDR3 (SEQ ID NO:76) de la SEQ ID NO:70.

En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:77 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 78. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:77 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:80) y CDR3 (SEQ ID NO:81) de la SEQ ID NO:77. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:78 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:82), CDR2 (SEQ ID NO:83) y CDR3 (SEQ ID NO:84) de la SEQ ID NO:78.

En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:85 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:86. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:85 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:87), CDR2 (SEQ ID NO:88), y CDR3 (SEQ ID NO:89) de la SEQ ID NO:85. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:86 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:90), CDR2 (SEQ ID NO:91) y CDR3 (SEQ ID NO:92) de la SEQ ID NO:86.

En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:93 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO: 94. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del primer sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:93 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:95), CDR2 (SEQ ID NO:96) y CDR3 (SEQ ID NO:97) de la SEQ ID NO:93. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:94 y/o incorpora secuencias

de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:98), CDR2 (SEQ ID NO:99) y CDR3 (SEQ ID NO:100), de la SEQ ID NO:94.

En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:101 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:102, tal como al tener una secuencia de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO: 101 y al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:102, respectivamente. En algunas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:103 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:104, tal como al tener una secuencia de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO:103 y al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO:104, respectivamente.

En algunas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno que se une a FLT3 puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:109 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:113. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:109 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO: 110), CDR2 (SEQ ID NO: 111), y CDR3 (SEQ ID NO: 112), de la SEQ ID NO:109. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:113 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:114), CDR2 (SEQ ID NO:115) y CDR3 (SEQ ID NO:116), de la SEQ ID NO:113.

De manera alternativa, el segundo sitio de unión al antígeno que se une a FLT3 puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:117 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:121. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:117 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:118), CDR2

(SEQ ID NO:119) y CDR3 (SEQ ID NO:120), de la SEQ ID NO:117. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:121 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:122), CDR2 (SEQ ID NO:123) y CDR3 (SEQ ID NO:124), de la SEQ ID NO: 121.

De manera alternativa, el segundo sitio de unión al antígeno que se une a FLT3 puede incorporar un dominio variable de cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:125 y un dominio variable de cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:129. Por ejemplo, el dominio variable de cadena pesada del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:125 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:126), CDR2 (SEQ ID NO:127) y CDR3 (SEQ ID NO:128), de la SEQ ID NO:125. De manera similar, el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno puede ser al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:129 y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias de CDR1 (SEQ ID NO:130), CDR2 (SEQ ID NO:131) y CDR3 (SEQ ID NO:132), de la SEQ ID NO:129.

En algunas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno incorpora un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera presente en el primer sitio de unión al antígeno.

En algunas modalidades, la proteína incorpora una parte de un dominio Fc del anticuerpo suficiente para unirse a CD16, en donde el dominio Fc del anticuerpo comprende dominios CH2 y bisagra y/o secuencias de aminoácidos al menos 90 % idénticas a la secuencia de aminoácidos 234-332 de un anticuerpo IgG humano.

También se proporcionan formulaciones que contienen cualquiera de las proteínas descritas en la presente; células que contienen uno o más ácidos nucleicos que expresan proteínas y métodos para potenciar la muerte de células tumorales mediante el uso de proteínas.

Otro aspecto de la invención proporciona: un método para tratar el cáncer en un paciente. El método comprende administrarle a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de unión multiespecífica descritas en la presente. Ejemplos de cánceres a ser tratados

mediante el uso de proteínas de unión multiespecífica incluyen leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia de células T, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica y leucemia de células pilosas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **La Figura 1** es una representación de un anticuerpo heterodimérico, multiespecífico. Cada brazo puede representar tanto el dominio de unión a NKG2D como el dominio de unión a FLT3. En algunas modalidades, los dominios de unión a NKG2D y FLT3 pueden compartir una cadena ligera común.

10 **La Figura 2** es una representación de un anticuerpo heterodimérico, multiespecífico. Tanto el dominio de unión a NKG2D como el dominio de unión a FLT3 pueden tener el formato de scFv (brazo derecho).

15 **La Figura 3** son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D humano recombinante en un ensayo ELISA.

La Figura 4 son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D recombinante de Cynomolgus en un ensayo ELISA.

20 **La Figura 5** son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D recombinante de ratón en un ensayo ELISA.

25 **La Figura 6** son gráficos de barra que demuestran la unión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a células EL4 que expresan NKG2D humano mediante citometría de flujo que muestra el múltiplo del fondo (FOB) de la intensidad promedio de fluorescencia (MFI).

La Figura 7 son gráficos de barra que demuestran la unión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a células EL4 que expresan NKG2D de ratón mediante citometría de flujo que muestra el múltiplo del fondo (FOB) de la intensidad promedio de fluorescencia (MFI).

30 **La Figura 8** son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión específica de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D-Fc humano recombinante al competir con el ligando natural ULBP-6.

La Figura 9 son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión específica de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D -Fc humano recombinante de ratón al competir con el ligando natural MICA.

La Figura 10 son gráficos lineales que demuestran la afinidad de unión específica de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) a NKG2D-Fc recombinante de ratón al competir con el ligando natural Rae-1 delta.

La Figura 11 son gráficos de barra que muestran la activación de NKG2D humano mediante dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) al cuantificar el porcentaje de células positivas para TNF- α , que expresan proteínas de fusión zeta NKG2D-CD3 humanas.

La Figura 12 son gráficos de barras que muestran la activación de NKG2D de ratón mediante los dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) al cuantificar el porcentaje de células positivas para TNF- α , que expresan proteínas de fusión zeta NKG2D-CD3 de ratón.

La Figura 13 son gráficos de barras que muestran la activación de células NK mediante los dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones).

La Figura 14 son gráficos de barras que muestran la activación de células NK humanas mediante los dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones).

La Figura 15 son gráficos de barras que muestran la activación de células NK de ratón mediante los dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones).

La Figura 16 son gráficos de barras que muestran la activación de células NK de ratón mediante los dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones).

La Figura 17 son gráficos de barras que muestran el efecto citotóxico de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) en células tumorales.

La Figura 18 son gráficos de barras que muestran la temperatura de fusión de dominios de unión a NKG2D (enumerados como clones) medidos por fluorimetría diferencial de barrido.

Las Figuras 19A-19C son gráficos de barras de activación sinérgica de células NK mediante el uso

de CD16 y unión a NKG2D. La Figura19A demuestra niveles de CD107a; la Figura19B demuestra niveles de IFN- γ ; la Figura 19C demuestra niveles de CD107a e IFN- γ . Los gráficos indican la media ($n = 2$) $\pm$ SD. Los datos son representativos de cinco experimentos independientes mediante el uso de cinco donadores sanos diferentes.

5

La Figura 20 es una representación de un TriNKET en la forma de Triomab, que es un anticuerpo biespecífico, trifuncional que mantiene una forma similar a IgG. Esta quimera consiste en dos semianticuerpos, cada uno con una cadena ligera y una pesada, que se originan de dos anticuerpos originales. La forma triomab puede ser una construcción heterodimérica que contiene 1/2 de anticuerpo de rata y 1/2 de anticuerpo de ratón.

10

La Figura 21 es una representación de un TriNKET en la forma de cadena ligera común KiH, que implica la tecnología de botones en ojales (KiH). KiH es un heterodímero que contiene 2 Fabs que se unen a la diana 1 y 2 y un Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización.

15

TriNKET en el formato KiH puede ser una construcción heterodimérica con 2 Fabs que se unen a la diana 1 y diana 2, que contiene dos cadenas pesadas diferentes y una cadena ligera común que se empareja con ambas cadenas pesadas.

La Figura 22 es una representación de un TriNKET en la forma de inmunoglobulina (DVD-Ig™) de dominio variable dual, que combina los dominios de unión a la diana de dos anticuerpos monoclonales a través de enlazadores de origen natural flexibles y produce una molécula tipo IgG tetravalente. DVD-Ig™ es una construcción homodimérica donde el antígeno 2 diana de dominio variable se fusiona al extremo N de un dominio variable del antígeno 1 diana de Fab. La forma de DVD-Ig™ contiene Fc normal.

20

25

La Figura 23 es una representación de un TriNKET en la forma de interfaz de Fab ortogonal (Orto-Fab), que es una construcción heterodimérica que contiene 2 Fabs que se unen a la diana 1 y diana 2 fusionadas al Fc. El emparejamiento de la cadena ligera (LC)-cadena pesada (HC) está asegurado por la interfaz ortogonal. La heterodimerización está asegurada por mutaciones en el Fc.

30

La Figura 24 es una representación de un TriNKET en el formato de Ig 2 en 1.

La Figura 25 es una representación de un TriNKET en la forma de ES, que es una construcción heterodimérica que contiene dos Fabs diferentes que se unen a la diana 1 y diana 2 fusionadas al

Fc. La heterodimerización está asegurada por mutaciones que favorecen las atracciones electrostáticas deseadas en el Fc.

La Figura 26 es una representación de un TriNKET en la forma de intercambio del brazo Fab: anticuerpos que intercambian brazos Fab al cambiar una cadena pesada y cadena ligera acoplada (media molécula) con un par de cadenas pesadas-ligeras de otra molécula, lo que resulta en anticuerpos biespecíficos. La forma de intercambio del brazo Fab (cFae) es un heterodímero que contiene 2 Fabs que se unen a la diana 1 y 2 y un Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización.

La Figura 27 es una representación de un TriNKET en la forma de SEED Body, que es un heterodímero que contiene 2 Fabs que se unen a la diana 1 y 2 y un Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización.

La Figura 28 es una representación de un TriNKET en la forma LuZ-Y, en la que una cremallera de leucina se utiliza para inducir la heterodimerización de dos HC diferentes. La forma LuZ-Y es un heterodímero que contiene dos scFabs diferentes que se unen a la diana 1 y 2, fusionadas al Fc. La heterodimerización se asegura a través de motivos de cremallera de leucina fusionados al extremo C del Fc.

La Figura 29 es una representación de un TriNKET en la forma Cov-X-Body.

Las Figuras 30A-30B son representaciones de los TriNKET en las formas $\kappa\lambda$ -Body, que son construcciones heterodiméricas con dos Fabs diferentes fusionados al Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización: un Fab que se dirige al antígeno 1 contiene kappa LC y el segundo Fab que se dirige al Antígeno 2 contiene lambda LC. La Figura 30A es una representación ilustrativa de una forma de $\kappa\lambda$ -Body; la Figura 30B es una representación ilustrativa de otro $\kappa\lambda$ -Body.

La Figura 31 es una construcción heterodimérica Oasc-Fab que incluye Fab que se une a la diana 1 y scFab que se une a la diana 2, ambos están fusionados al dominio Fc. La heterodimerización está asegurada mediante mutaciones en el dominio Fc.

La Figura 32 es un DuetMab, que es una construcción heterodimérica que contiene 2 Fabs diferentes que se unen a los antígenos 1 y 2 y un Fc que se estabiliza mediante mutaciones de

heterodimerización. Fab 1 y 2 contienen puentes S-S diferenciales que aseguran el emparejamiento correcto de la cadena ligera y la cadena pesada.

La Figura 33 es un CrossmAb, que es una construcción heterodimérica que contiene 2 Fabs diferentes que se unen a las dianas 1 y 2 y un Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización. Los dominios CL y CH1 y los dominios VH y VL están cambiados, por ejemplo, CH1 está fusionado en línea con VL, mientras que CL está fusionado en línea con VH.

La Figura 34 es una Fit-Ig, que es una construcción homodimérica donde el Fab que se une al antígeno 2 está fusionado al extremo N del HC del Fab que se une al antígeno 1. La construcción contiene Fc de tipo salvaje.

La Figura 35 son gráficos lineales que muestran la unión de los TriNKET que se dirigen a FLT3 con NKG2D expresado sobre células EL4. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10 como control.

Las Figuras 36A y 36B son gráficos lineales que muestran la unión de los TriNKET que se dirigen a FLT3 con FLT3 expresado en las líneas celulares de AML Molm-13 (Figura 36A) y EOL-1 (Figura 36B). Se utilizó el anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10 como control.

Las Figuras 37A y 37B son gráficos lineales que muestran la internalización de los TriNKET que se dirigen a FLT3 sobre células EOL-1 (Figura 37A) y células Molm-13 (Figura 37B) luego de 2 horas y 20 horas de incubación a 37 °C. Se utilizó Lintuzumab como un control.

Las Figuras 38A y 38B son gráficos lineales que muestran citotoxicidad mediada por los TriNKET de células NK humanas hacia células EOL-1 que expresan FLT3. El anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10 y los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 que se origina de IMCEB10 se muestran en La Figura 38A. El anticuerpo monoclonal de FLT3 4G8 y los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 que se origina de 4G8 se muestran en la Figura 38B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención proporciona proteínas de unión multiespecífica que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en células asesinas naturales, y el antígeno asociado a tumores FLT3. En algunas modalidades, las proteínas multiespecíficas incluyen además un sitio de unión al antígeno adicional

que se une a FLT3 u otro antígeno asociado a tumores. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de unión multiespecífica y métodos terapéuticos utilizando dichas proteínas de unión multiespecífica y composiciones farmacéuticas, con fines tales como el tratamiento del cáncer. A continuación, se indican diversos aspectos de la invención en secciones. No obstante, los aspectos de la invención descritos en una sección particular no se deben limitar a ninguna sección particular.

Se definen a continuación una serie de términos y frases para facilitar la comprensión de la presente invención.

Los términos “un” y “una” tal como se utilizan en la presente, significan “uno/a o más” e incluyen el plural, salvo que el contexto no lo permita.

Tal como se usa en la presente, la presente, la expresión “sitio de unión al antígeno” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. En anticuerpos humanos, el sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables (“V”) del extremo N de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres extensiones altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se mencionan como “regiones hipervariables” que están interpuestas entre extensiones flanqueantes más conservadas conocidas como “regiones marco” o “FR”. Por lo tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre regiones hipervariables y adyacentes a estas en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo humano, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen en relación una a la otra en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria de la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. En determinados animales, tales como camélidos y peces cartilaginosos, el sitio de unión al antígeno se forma mediante una única cadena de anticuerpo proporcionando un “anticuerpo de dominio único”. Los sitios de unión al antígeno pueden existir en un anticuerpo intacto, en un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que retiene la superficie de unión al antígeno o en un polipéptido recombinante tal como un scFv, mediante el uso de un enlazador peptídico para conectar el dominio variable de cadena pesada al dominio variable de cadena ligera en un único polipéptido.

La expresión “antígeno asociado a tumores” tal como se usa en la presente significa cualquier antígeno que incluye, de modo no taxativo, una proteína, glicoproteína, gangliósido, carbohidrato, lípido que está asociado al cáncer. Dicho antígeno puede expresarse en células malignas o en el microambiente tumoral tal como vasos sanguíneos asociados a tumores, matriz extracelular, estroma mesenquimal o infiltrados inmunes.

Tal como se usan en la presente, los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a un organismo a ser tratado con los métodos y composiciones descritos en la presente. Dichos organismos preferentemente incluyen, de modo no taxativo, mamíferos (p. ej., murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares), y más preferentemente incluyen seres humanos.

Tal como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto (p. ej., un compuesto de la presente invención) suficiente para provocar resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración particular. Tal como se usa en la presente, el término "tratar" incluye cualquier efecto, p. ej., disminución, reducción, modulación, mejora o eliminación, que da como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o mejora de un síntoma de estos.

Tal como se usa en la presente, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a la combinación de un agente activo con un portador inerte o activo, lo que hace a la composición especialmente adecuada para el uso de diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*.

Tal como se usa en la presente, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier portador farmacéutico estándar, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite) y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para acceder a ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes, véase, *p.ej.* Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15.^a Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

Tal como se usa en la presente, la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, ácido o base) de un compuesto de la presente invención que, tras la administración a un sujeto, puede proporcionar un compuesto de la presente invención o un metabolito activo o residuo de este. Tal como reconocen los expertos en la

técnica, las “sales” de los compuestos de la presente invención pueden obtenerse a partir de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de ácidos incluyen, de modo no taxativo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Se pueden emplear otros ácidos, tales como los oxálicos, aunque no sean farmacéuticamente aceptables en sí mismos, en la preparación de sales útiles como intermediarios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables.

- 10 Los ejemplos de bases incluyen, de modo no taxativo, hidróxidos de metal alcalino (p. ej., sodio), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ej., magnesio), amoníaco, y compuestos de fórmula NW_4^+ , donde W es alquilo C_{1-4} , y similares.

- Los ejemplos de sales incluyen, de modo no taxativo: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canfosulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención compuestos con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en donde W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares.

- Para uso terapéutico, las sales de los compuestos de la presente invención se contemplan como farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, también pueden usarse sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

- En toda la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos o cuando se describe que los procesos y métodos tienen, incluyen o comprenden etapas específicas, se contempla que además hay composiciones de la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes mencionados y que hay procesos y métodos conforme a la presente invención que consisten esencialmente en o consisten en las etapas de procesamiento mencionadas.

Como hecho general, las composiciones que indican un porcentaje son en peso a menos que se indique de otro modo. Además, si una variable no se encuentra acompañada por una definición, entonces rige la definición previa de la variable.

5 I. Proteínas

La invención proporciona proteínas de unión multiespecífica que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 sobre células asesinas naturales, y el antígeno asociado a tumores FLT3. Las proteínas de unión multiespecífica son útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos descritos en la presente. La unión de las proteínas de unión multiespecífica al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en una célula asesina natural potencia la actividad de la célula asesina natural hacia la destrucción de células tumorales que expresan FLT3. La unión de las proteínas de unión multiespecífica con células que expresan FLT3 hace que las células cancerosas se acerquen a las células asesinas naturales, lo que facilita la destrucción directa e indirecta de las células cancerosas por la célula asesina natural. Se proporciona a continuación una descripción adicional de algunos ejemplos de proteínas de unión multiespecífica.

El primer componente de las proteínas de unión multiespecífica se une a células que expresan el receptor de NKG2D, que puede incluir, de modo no taxativo, células NK, células T $\gamma\delta$ y células T CD8⁺ $\alpha\beta$. Tras la unión de NKG2D, las proteínas de unión multiespecífica pueden bloquear ligandos naturales, tales como ULBP6 y MICA, de la unión a NKG2D y activar receptores de NKG2D.

El segundo componente de las proteínas de unión multiespecífica se une a FLT3. Las células que expresan FLT3 pueden encontrarse en la leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda y leucemia de células T.

El tercer componente para las proteínas de unión multiespecífica se une a células que expresan CD16, un receptor de Fc en la superficie de leucocitos que incluyen células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y células dendríticas foliculares.

Las proteínas de unión multiespecífica descritas en la presente pueden tener varios formatos. Por ejemplo, un formato es un anticuerpo heterodimérico, multiespecífico que incluye una primera cadena pesada de inmunoglobulina, una primera cadena ligera de inmunoglobulina, una segunda cadena pesada de inmunoglobulina y una segunda cadena ligera de inmunoglobulina (Figura 1). La

primera cadena pesada de inmunoglobulina incluye un primer dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), un primer dominio variable de cadena pesada y opcionalmente un primer dominio de cadena pesada CH1. La primera cadena ligera de inmunoglobulina incluye un primer dominio variable de cadena ligera y un primer dominio constante de cadena ligera. La primera cadena ligera de inmunoglobulina, junto con la primera cadena pesada de inmunoglobulina, forman un sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D. La segunda cadena pesada de inmunoglobulina comprende un segundo dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), un segundo dominio variable de cadena pesada y opcionalmente un segundo dominio de cadena pesada CH1. La segunda cadena ligera de inmunoglobulina incluye un segundo dominio variable de cadena ligera y un segundo dominio constante de cadena ligera. La segunda cadena ligera de inmunoglobulina, junto con la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, forman un sitio de unión al antígeno que se une a FLT3. El primer dominio Fc y el segundo dominio Fc juntos son capaces de unirse a CD16 (Figura 1). En algunas modalidades, la primera cadena ligera de inmunoglobulina es idéntica a la segunda cadena ligera de inmunoglobulina.

Otro ejemplo de formato involucra un anticuerpo heterodimérico, multiespecífico que incluye una primera cadena pesada de inmunoglobulina, una segunda cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina (Figura 2). La primera cadena pesada de inmunoglobulina incluye un primer dominio Fc (bisagra-CH2-CH3) fusionado, a través de un enlazador o una bisagra de anticuerpo, a un fragmento variable de cadena única (scFv) compuesto por un dominio variable de cadena pesada y dominio variable de cadena ligera que se emparejan y se unen a NKG2D o se unen al antígeno de FLT3. La segunda cadena pesada de inmunoglobulina incluye un segundo dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), un segundo dominio variable de cadena pesada y opcionalmente un dominio de cadena pesada CH1. La cadena ligera de inmunoglobulina incluye un dominio variable de cadena ligera y un dominio constante de cadena ligera. La segunda cadena pesada de inmunoglobulina se empareja con la cadena ligera de inmunoglobulina y se une a NKG2D o se une al antígeno asociado a tumores FLT3. El primer dominio Fc y el segundo dominio Fc juntos son capaces de unirse a CD16 (Figura 2).

Uno o más motivos de unión adicionales pueden fusionarse al extremo C del dominio CH3 de la región constante, opcionalmente a través de una secuencia enlazadora. En determinadas modalidades, el motivo de unión al antígeno es una región variable de cadena única o estabilizada por disulfuro (scFv) que forma una molécula tetravalente o trivalente.

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de Triomab, que es un anticuerpo biespecífico, trifuncional que mantiene una forma similar a IgG. Esta quimera consiste en dos semianticuerpos, cada uno con una cadena ligera y una pesada, que se originan de dos anticuerpos originales.

5

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica es la forma de cadena ligera común (LC) de KiH, que implica la tecnología de botones en ojales (KiH). La KiH implica modificar dominios C_H3 para crear un “botón” o un “ojal” en cada cadena pesada para promover la heterodimerización. El concepto detrás de la tecnología de Fc “botones en ojales (KiH)” fue introducir un “botón” en un dominio CH3 (CH3 A) mediante la sustitución de un pequeño residuo con uno voluminoso (p. ej. T366W_{CH3A} en la numeración de UE). Para alojar el “botón”, se creó una superficie de “ojal” complementaria en el otro dominio CH3 (CH3B) al reemplazar los residuos vecinos más cercanos al botón con los más pequeños (p. ej. T366S/L368A/Y407V_{CH3B}). La mutación de “ojal” fue optimizada mediante análisis de biblioteca de fagos estructurado, guiado (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library, *J. Mol. Biol.* (1997) 270(1):26-35). Las estructuras de cristales de rayos X de variantes de Fc KiH (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, *et al.*, Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. *J. Mol. Biol.* (2014) 426(9): 1947-57; Mimoto F, Kadono S, KatadaH, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol. Immunol.* (2014) 58(1): 132-8) demostraron que la heterodimerización es favorecida termodinámicamente mediante interacciones hidrofóbicas impulsadas por complementariedad estérica en la interfaz del núcleo del dominio inter-CH3, mientras que las interfaces botón-botón y ojal-ocal no favorecen la homodimerización a causa del bloqueo y disrupción estéricos de las interacciones favorables, respectivamente.

25

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-IgTM), que combina los dominios de unión a la diana de dos anticuerpos monoclonales a través de enlazadores de origen natural flexibles y produce una molécula tipo IgG tetravalente.

30

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica está en la forma de interfaz de Fab ortogonal (Ortho-Fab). En el enfoque de IgG Ortho-Fab (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, *et ál.*, Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an

orthogonal Fab interface. *Nat. Biotechnol.* (2014) 32(2): 191-8), el diseño regional a base de estructura introduce mutaciones complementarias en la interfaz de LC y HC_{VH-CH1} en solamente un Fab, sin que se hayan realizado cambios en el otro Fab.

- 5 En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene el formato de Ig 2 en 1. En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de ES, que es una construcción heterodimérica que contiene dos Fabs diferentes que se unen a la diana 1 y diana 2 fusionadas al Fc. La heterodimerización está asegurada por mutaciones que favorecen las atracciones electrostáticas deseadas en el Fc.

10

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de κλ-Body, que es una construcción heterodimérica que contiene dos Fabs diferentes fusionados al Fc estabilizados mediante mutaciones de heterodimerización: Fab1 que se dirige al antígeno 1 contiene kappa LC, mientras que el segundo Fab que se dirige al antígeno 2 contiene lambda LC. La Figura 30A es una
 15 representación ilustrativa de una forma de un κλ-Body; la Figura 30B es una representación ilustrativa de otro κλ-Body.

20

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de intercambio del brazo Fab (anticuerpos que intercambian brazos Fab al cambiar una cadena pesada y cadena ligera acoplada (media molécula) con un par de cadenas pesadas-ligeras de otra molécula, lo que resulta en anticuerpos biespecíficos).

25

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma SEED Body. La plataforma de dominio modificado por intercambio de cadena (SEED) fue diseñada para generar
 25 moléculas tipo anticuerpos asimétricas y biespecíficas, una capacidad que amplía las aplicaciones terapéuticas de anticuerpos naturales. Esta plataforma modificada de proteína se basa en el intercambio de secuencias estructuralmente relacionadas de inmunoglobulina dentro de los dominios CH3 conservados. El diseño SEED permite la generación eficiente de heterodímeros AG/GA, mientras desfavorece la homodimerización de dominios CH3 SEED AG y GA. (Muda M. et
 30 ál., *Protein Eng. Des. Sei.* (2011, 24(5):447-54)).

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma LuZ-Y, en la que una cremallera de leucina se utiliza para inducir la heterodimerización de dos HC diferentes. (Wranik, BJ. et ál., *J. Biol. Chem.* (2012), 287:43331-9).

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de CovX-Body. En CovX-Bodies biespecíficos, dos péptidos diferentes se unen entre sí mediante el uso de un enlazador de azetidinona ramificado y se fusionan al anticuerpo de armazón en condiciones templadas de una manera específica de sitio. Mientras que los farmacóforos son responsables de las actividades funcionales, el anticuerpo de armazón presenta larga semivida y distribución de tipo Ig. Los farmacóforos pueden optimizarse químicamente o reemplazarse con otros farmacóforos para generar anticuerpos biespecíficos optimizados o únicos. (Doppalapudi *VR et ál.,PNAS* (2010), 107(52);22611-22616).

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica está en una forma heterodimérica Oasc-Fab que incluye a Fab que se une a la diana 1 y scFab que se une a la diana 2 fusionada al Fc. La heterodimerización está asegurada por mutaciones en el Fc.

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de DuetMab, que es una construcción heterodimérica que contiene dos Fabs diferentes que se unen a los antígenos 1 y 2 y Fc estabilizado mediante mutaciones de heterodimerización. Fab 1 y 2 contienen puentes S-S diferenciales que aseguran el emparejamiento correcto de LC y HC.

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene la forma de CrossmAb, que es una construcción heterodimérica que contiene dos Fabs diferentes que se unen a las dianas 1 y 2 fusionadas al Fc estabilizado mediante heterodimerización. Los dominios CL y CH1 y los dominios VH y VL están cambiados, por ejemplo, CH1 está fusionado en línea con VL, mientras que CL está fusionado en línea con VH.

En algunas modalidades, la proteína de unión multiespecífica tiene una forma de Fit-Ig, que es una construcción homodimérica donde el Fab que se une al antígeno 2 está fusionado al extremo N del HC del Fab que se une al antígeno 1. La construcción contiene Fc de tipo salvaje.

La Tabla 1 enumera secuencias peptídicas de dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera que, en combinación, pueden unirse a NKG2D. Los dominios de unión a NKG2D pueden variar en su afinidad de unión a NKG2D, sin embargo, todos activan a NKG2D humano y células NK.

Tabla 1		
Clones	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada secuencia	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera
ADI- 27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1) CDR1 (SEQ ID NO: 105)- GSFSGYYWS CDR2 (SEQ ID NO: 106) - EIDHSGSTNYPNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO: 107)- ARARGPWSFDP	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI- 27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSSYL AW YQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQ YGS SPITFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:4)
ADI- 27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYHSFYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)
ADI- 27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQSNSYYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

5	ADI- 27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
10	ADI- 28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWGFDPPWGQGT L VT VS S (SEQ ID NO: 11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRF SGS GSGTDFTLTISLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
15	ADI- 28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14)
20	ADI- 28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTDFTLTISLQPDDEFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:16)
25	ADI- 29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:18)
30			

5	ADI- 29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:20)
10	ADI- 29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)
15	ADI- 29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)
20	ADI- 29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYQSFPFSGGGTKVEIK (SEQ ID NO:26)
25	ADI- 29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQ YS SF STFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 28)
30			

ADI- 29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:30)
ADI- 29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:32)
ADI- 29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:34)
ADI- 29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:36)
ADI- 29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYELYSYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:38)

5	ADI- 29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDTFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:40)
10	ADI- 27727	GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSED AVYYC AR GDSSIRHAYYYYGMDVWGQGT TVSS (SEQ ID NO:41) CDR1 (SEQ ID NO:43) - GTFSSYAIS CDR2 (SEQ ID NO:44) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:45)- ARGDS SIRHAYYYYGMDV	QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQQYYSTPITFGG GTKVEIK (SEQ ID NO:42) CDR1 (SEQ ID NO:46) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:47) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:48) - QQYYSTPIT
20	ADI- 29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSSIS S S S YYWGWIRQPPGKGLEWI GSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARG SDRFHP YFD YWGQGT VTVS S (SEQ ID NO:49) CDR1 (SEQ ID NO:51)- GSISSSSYYWG CDR2 (SEQ ID NO:52)- SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:53)- ARGSDRFHPYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLLIYD ASNRATGIPARF SG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQFDTWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50) CDR1 (SEQ ID NO:54)- RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:55)- DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:56)- QQFDTWPPT

5	ADI- 29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSF SGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTS KNQF SLKL S SVT AADT AVYYC ARA RGPWSFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKAS SLESGVPSRF SG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:58)
10 15 20 25	ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTF S S YAIWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSED AVYYC AR RGRKASGSFYFYYGMDVWGQGT TVSS (SEQ ID NO:59) CDR1 (SEQ ID NO: 134)- GTFSSYAI CDR2 (SEQ ID NO: 135) - GGIPIFGTANYAQKFQ CDR3 (SEQ ID NO: 136)- ARRGRKASGSFYFYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKPLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNDYSYPYTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO:60) CDR1 (SEQ ID NO: 137)- ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO: 138)- WASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 139)- QNDYSYPYT

ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYMHWRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYY CARGAPNYGDTTHDYYYMDVWG KGTT VTVSS (SEQ ID NO:61) CDR1 (SEQ ID NO:63)- YTFTSYMH CDR2 (SEQ ID NO:64)- IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65)- ARGAPNYGDTTHDYYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIP ARE SG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:66) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:67) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:68) - QQYDDWPFT
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTGYMHWRQAPGQGLE WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSLRSDDTAV YYCARDTGEYYDTDDHGMDVWG QGTT VTVSS (SEQ ID NO:69) CDR1 (SEQ ID NO:71)- YTFTGYMH CDR2 (SEQ ID NO:72)- WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:73)- ARDTGEYYDTDDHGMDV	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIP ARE SG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:70) CDR1 (SEQ ID NO:74) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:75) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:76) - QQDDYWPPT

ADI- 27744 (A44)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTF S S YAMSWVRQ APGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDGGYYDSGAGDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:77) CDR1 (SEQ ID NO:79) - FTFSSYAMS CDR2 (SEQ ID NO:80)- AISGSGGSTYYADSVK G CDR3 (SEQ ID NO:81)- AKDGGYYDSGAGDY	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAAS SLQ SGVPSRF SG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:82)- RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:83)- AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:84) - QQGVSYPR
ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFS S YSMNWVRQ APGKGLEW VSSISSSSS YIYYADS VKGRFTISR D NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGAPMGAAAGWFD PWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:85) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYS MN CDR2 (SEQ ID NO:88)- SISSSSSYIYYADSVK G CDR3 (SEQ ID NO:89)- ARGAPMGAAAGWFD P	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIS SWL AWYQQKPGK APKLLIYAAS SLQ SGVPSRF SG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:90) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:91)- AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:92) - QQGVSFPR

ADI- 29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYY CAREGAGFAYGMDYYYMDVWGK GTTVTVSS (SEQ ID NO:93) CDR1 (SEQ ID NO:95)- YTFTSYMH CDR2 (SEQ ID NO:96) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:97)- AREGAGFAYGMDYYYMDV	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARF SG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:98) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:99) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO: 100)- QQSDNWPFT
------------------------	--	---

De manera alternativa, un dominio variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO:101 puede emparejarse con un dominio variable de cadena ligera representado por la SEQ ID NO:102 para formar un sitio de unión al antígeno que se puede unir a NKG2D, tal como se ilustró en US 9,273,136.

SEQ ID NO:101

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGQGT
TVSS

SEQ ID NO:102

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSGVSD
RFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

De manera alternativa, un dominio variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO:103 puede emparejarse con un dominio variable de cadena ligera representado por la SEQ ID NO:104 para formar un sitio de unión al antígeno que se puede unir a NKG2D, tal como se ilustró en US 7,879,985.

SEQ ID NO:103

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTSS

SEQ ID NO:104

5 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

En un aspecto, la presente descripción proporciona proteínas de unión multiespecífica que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en células asesinas naturales, y el antígeno FLT3. La Tabla 2 enumera algunas secuencias ilustrativas de dominios variables de cadena pesada y dominios variables de cadena ligera que, en combinación, pueden unirse a FLT3.

Tabla 2		
Clones	Secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada	Secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera
anti-FLT3 (IMCEB10) (Patente estadounidense N.º 8,071,099)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYMHWRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARGVGAHDAFDIWGQGTTVT VSSA (SEQ ID NO: 109) CDR1 (SEQ ID NO: 110) - GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:111) - NPSGGS CDR3 (SEQ ID NO: 112)- GVGAHDAFDI	DVVMTQSPLSLPVTSGE PASISCRSSQSLLHSNGN NYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPDRF SG SGSDTDFTLQISRVEAED VGVYYCMQGTHPAISFG QGTRLEIKR (SEQ ID NO: 113) CDR1(SEQ ID NO: 114) - QSLLHSNGNNYLD CDR2 (SEQ ID NO: 115)- LGSNRAS CDR3 (SEQ ID NO: 116)- MQGTHPAIS

anti-FLT3 (4G8) (Patente estadounidense N.º 9,023,996)	QVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKS SGYTFTSYWMHWVRQRPBGHLE WIGEIDPSDSYKDYNQKFKDKATL TVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVY YC ARAITTTTPDF WGQGTTLT VS S (SEQ ID NO: 117) CDR1 (SEQ ID NO: 118)- SYWMH CDR2 (SEQ ID NO: 119)- EIDPSDSYKDYNQKFKD CDR3 (SEQ ID NO: 120)- AITTTTPDF	DIVLTQSPATLSVTPGDS VSLSCRASQSISSNNLHW YQQKSHESPRLLIKYAS QSIGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVETEDFGVYFCQ QSNTWPYTFGGGKLEI KR (SEQ ID NO: 121) CDR1 (SEQ ID NO: 122)- RASQSISSNNLH CDR2 (SEQ ID NO: 123)- YASQSISS CDR3 (SEQ ID NO: 124)- QQSNTWPYT
anti-FLT3 (BV10) (Patente estadounidense N.º 9,023,996)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVS GFSLTNYGLHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGSTDYNAAFISRLSISKDN SKSQVFFKMNSLQ ADDTAI YC AR KGGIYYANHYYAMDYWGQGTSTV TVSS (SEQ ID NO: 125) CDR1 (SEQ ID NO: 126) - NYGLH CDR2 (SEQ ID NO: 127)- VIWSGGSTDYNAAFIS CDR3 (SEQ ID NO: 128)- KGGIYYANHYYAMDY	DIVMTQSPSSLSVSAGEK VTMSCKSSQSLLNSGNQ KNYMAYQQKPGQPPKL LIYGASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAED LAVYYCQNDHSYPLTFG AGTKLELKR (SEQ ID NO: 129) CDR1 (SEQ ID NO: 130)- KSSQSLLNSGNQKNYM A CDR2 (SEQ ID NO: 131)- GASTRES CDR3 (SEQ ID NO: 132)- QNDHSYPLT

De manera alternativa, los sitios de unión al antígeno novedosos que pueden unirse a FLT3 pueden

identificarse mediante análisis para la unión a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 133.

SEQ ID NO: 133

MPALARDGGQLPLLVFSA MIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSESPEDLG CAL
 5 RPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHFDLQNRGVVSMVILKM
 TETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKMENQDALVCISESVPEPIVEWVLCDS
 QGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNELGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPLQLFLKVGEPL
 WIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEGNYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSK
 HPSQSAVTIVEKGFINATNSSDYEDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTF SRKSFPCEQKGLDNGY
 10 SISKFCNHKHQPGEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKK
 CSDKSPNCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNSP
 GPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTL LICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYFYVDFREYEYD
 LKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVS IQVAVKMLKEKADSSEREALMSELKMM
 TQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKREKFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSH
 15 PNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKG
 MEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGI
 YTIKSDVWSYGILLWEIFSLGVNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIMQSCWAFDSRK
 RPSFPNLTSFLGCQLADAE EAMYQNVDGRVSECPHTYQNRPF SREM DLGLLSPQAQVEDS

20 Dentro del dominio Fc, la unión de CD16 está mediada por la región bisagra y el dominio CH2. Por
 ejemplo, dentro de la IgG1 humana, la interacción con CD16 está enfocada principalmente en
 residuos de aminoácidos Asp 265 - Glu 269, Asn 297 - Thr 299, Ala 327 - Ile 332, Leu 234 - Ser 239,
 y el residuo de carbohidrato N-acetil-D-glucosamina en el dominio CH2 (véase, Sondermann *et ál.*,
 Nature, 406 (6793):267-273). Las mutaciones pueden seleccionarse para aumentar o reducir la
 25 afinidad de unión al CD16 en función de dominios conocidos, tal como al utilizar bibliotecas de
 visualización de fagos o bibliotecas de ADNc de visualización de superficie de levadura, o pueden
 diseñarse en función de la estructura tridimensional conocida de la interacción.

El ensamblaje de cadenas pesadas de anticuerpos heterodiméricos puede lograrse al expresar dos
 30 secuencias de cadena pesada de anticuerpos diferentes en la misma célula, que puede conducir al
 ensamblaje de homodímeros de cada cadena pesada del anticuerpo, así como ensamblaje de
 heterodímeros. Promover el ensamblaje preferencial de heterodímeros puede lograrse al incorporar
 diferentes mutaciones en el dominio CH3 de cada región constante de cadena pesada del anticuerpo
 como se muestra en US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934,

US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480, y US 14/830336. Por ejemplo, se pueden realizar las mutaciones en el dominio CH3 en función de IgG1 humana e incorporar pares distintos de sustituciones de aminoácidos dentro de un primer polipéptido y un segundo polipéptido lo que permite que estas dos cadenas heterodimericen selectivamente entre sí. Las posiciones de las sustituciones de aminoácidos ilustradas más adelante están todas numeradas de acuerdo con el índice de UE como en Kabat.

En un escenario, una sustitución de aminoácidos en el primer polipéptido reemplaza el aminoácido original con un aminoácido más grande, seleccionado de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W) y al menos una sustitución de aminoácidos en el segundo polipéptido reemplaza el o los aminoácidos originales con el o los aminoácidos más pequeños, elegidos de alanina (A), serina (S), treonina (T) o valina (V), de forma tal que la sustitución de aminoácidos más grande (una protuberancia) encaja en la superficie de las sustitución de aminoácidos más pequeños (una cavidad). Por ejemplo, un polipéptido puede incorporar una sustitución de T366W y el otro puede incorporar tres sustituciones que incluyen T366S, L368A, y Y407V.

Un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo de la invención puede opcionalmente estar acoplado a una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a una región constante del anticuerpo, tal como una región constante de IgG que incluye dominios bisagra, CH2 y CH3 con o sin dominio CH1. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región constante es al menos 90 % idéntica respecto a una región constante de anticuerpo humano, tal como una región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 o región constante de IgG4. En algunas otras modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región constante es al menos 90 % idéntica a una región constante de anticuerpo de otro mamífero, tal como conejo, perro, gato, ratón o caballo. Una o más mutaciones pueden incorporarse en la región constante en comparación con la región constante de IgG1 humana, por ejemplo, en Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y/o K439. Sustituciones ilustrativas incluyen, por ejemplo, Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, T350V, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S, L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, T394W, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D, y K439E.

En determinadas modalidades, las mutaciones que pueden incorporarse en el CH1 de una región constante de IgG1 humana puede ser en el aminoácido V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171, y/o V173. En determinadas modalidades, las mutaciones que pueden incorporarse en el Ck de una región constante de IgG1 humana puede ser en el aminoácido E123, F116, S176, V163, S174, y/o T164.

De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes grupos de sustituciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Grupo 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
Grupo 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
Grupo 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
Grupo 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
Grupo 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
Grupo 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
Grupo 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
Grupo 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
Grupo 9	L368D/K370S	S364K
Grupo 10	L368E/K370S	S364K
Grupo 11	K360E/Q362E	D401K
Grupo 12	L368D/K370S	S364K/E357L
Grupo 13	K370S	S364K/E357Q
Grupo 14	F405L	K409R
Grupo 15	K409R	F405L

De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes grupos de sustituciones que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Grupo 1	K409W	D399V/F405T
Grupo 2	Y349S	E357W
Grupo 3	K360E	Q347R
Grupo 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Grupo 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Grupo 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes grupos de sustituciones que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Grupo 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Grupo 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Grupo 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Grupo 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Grupo 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Grupo 6	E356K/D399K	K392D/K409D

De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos en cada cadena de polipéptidos podría seleccionarse de la Tabla 6.

Tabla 6	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D y T411E

De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos podría seleccionarse del siguiente grupo de sustituciones en la Tabla 7, donde la o las posiciones indicadas en la columna “Primer polipéptido” se reemplazan por cualquier aminoácido negativamente cargado conocido y la o las posiciones indicadas en la columna “Segundo polipéptido” se reemplazan por cualquier aminoácido positivamente cargado.

Tabla 7	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
K392, K370, K409, o K439	D399, E356, o E357

De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos podría seleccionarse del siguiente grupo de en la Tabla 8, donde la o las posiciones indicadas en la columna “Primer polipéptido” se reemplazan por cualquier aminoácido positivamente cargado conocido y la o las posiciones indicadas en la columna “Segundo polipéptido” se reemplazan por cualquier aminoácido negativamente cargado conocido.

Tabla 8	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
D399, E356, o E357	K409, K439, K370, o K392

De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse del siguiente grupo en la Tabla 9.

Tabla 9	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
T350V, L351Y, F405A, y Y407V	T350V, T366L, K392L, y T394W

De manera alternativa, o, además, la estabilidad estructural de una proteína hetero-multimérica puede aumentar al introducir S354C en la primera o segunda cadena polipeptídica y Y349C en la cadena polipeptídica opuesta, que forma un puente disulfuro artificial dentro de la interfaz de los dos polipéptidos.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en la posición T366 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, L368 y Y407.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, L368 y Y407, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en la posición T366.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405, y T411 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 y T411.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 y T411 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica

de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en E357, K360, Q362, S364, L368, K370, T394, D401, F405, y T411.

- 5 En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, D399, S400 y Y407 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más
10 posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, N390, K392, K409, y T411.

- En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366, N390, K392, K409 y T411
15 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, D399, S400 y Y407.

- En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, K360, y K409 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más
20 posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, E357, D399 y F405.

- 25 En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, E357, D399 y F405 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más
30 posiciones seleccionadas del grupo que consiste en, Y349, K360, Q347 y K409.

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1

en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K370, K392, K409 y K439 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en D356, E357 y D399.

5

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en D356, E357 y D399, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K370, K392, K409 y K439.

10

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, E356, T366 y D399 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, L351, L368, K392 y K409.

15

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, L351, L368, K392 y K409 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, E356, T366 y D399.

20

25

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por una sustitución S354C y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por una sustitución Y349C.

30

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1

por una sustitución Y349C y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por una sustitución S354C.

- 5 En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones K360E y K409W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones O347R, D399V y F405T.

10

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones O347R, D399V y F405T y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones K360E y K409W.

15

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T366W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T366S, T368A y Y407V.

20

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T366S, T368A y Y407V y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por una sustitución T366W.

25

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T350V, L351Y, F405A y Y407V y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T350V, T366L, K392L y T394W.

30

En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T350V, T366L, K392L y T394W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena polipeptídica de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de la IgG1 por las sustituciones T350V, L351Y, F405A y Y407V.

Las proteínas multiespecíficas descritas anteriormente pueden producirse mediante el uso de tecnología de ADN recombinante conocida para un experto en la técnica. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la primera cadena pesada de inmunoglobulina puede clonarse en un primer vector de expresión; una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda cadena pesada de inmunoglobulina puede clonarse en un segundo vector de expresión; una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina puede clonarse en un tercer vector de expresión; y el primer, segundo y tercer vector de expresión pueden transfectarse de manera estable juntos en células huésped para producir las proteínas multiméricas.

Para lograr el mayor rendimiento de la proteína multiespecífica, pueden explorarse diferentes relaciones del primer, segundo y tercer vector de expresión para determinar la relación óptima para la transfección en las células huésped. Luego de la transfección, pueden aislarse clones únicos para la generación de bancos de células mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como dilución limitada, ELISA, FACS, microscopía o Clonepix.

Los clones pueden cultivarse en condiciones adecuadas para el escalado de biorreactores y expresión sostenida de la proteína multiespecífica. Las proteínas multiespecíficas pueden aislarse y purificarse mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen centrifugación, filtración en profundidad, lisis celular, homogeneización, congelación/descongelación, purificación de afinidad, filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio de interacción hidrofóbica y cromatografía de modo mixto.

II. Características de las Proteínas multiespecíficas

Las proteínas multiespecíficas descritas en la presente incluyen un sitio de unión a NKG2D, un sitio de unión a CD16 y un sitio de unión a FLT3. En algunas modalidades, las proteínas multiespecíficas se unen a células que expresan NKG2D y/o CD16, tales como las células NK y células tumorales que expresan FLT3 simultáneamente. La unión de las proteínas multiespecíficas a las células NK

puede aumentar la actividad de las células NK hacia la destrucción de las células tumorales.

En algunas modalidades, las proteínas multiespecíficas se unen a FLT3 con una afinidad similar al anticuerpo monoclonal de FLT3 correspondiente (es decir, un anticuerpo monoclonal que contiene el mismo sitio de unión a FLT3 como el incorporado en las proteínas multiespecíficas). En algunas modalidades, las proteínas multiespecíficas son más eficaces en matar las células tumorales que expresan FLT3 que los anticuerpos monoclonales de FLT3 correspondientes.

En determinadas modalidades, las proteínas multiespecíficas descritas en la presente, que incluyen un sitio de unión a NKG2D y un sitio de unión para FLT3, activan las células NK humanas principales cuando se co-cultivan con células que expresan FLT3. La activación de células NK está marcada por el aumento en la degranulación de CD107a y la producción de citocinas IFN- γ . Además, en comparación con un anticuerpo monoclonal de FLT3 correspondiente, las proteínas multiespecíficas pueden mostrar una activación superior de células NK humanas en presencia de células que expresan FLT3.

En determinadas modalidades, las proteínas multiespecíficas descritas en la presente, que incluyen un sitio de unión a NKG2D y un sitio de unión para FLT3, aumentan la actividad de células NK inactivas y activadas por IL-2 humanas que se co-cultivan con células que expresan FLT3.

En determinadas modalidades, en comparación con un anticuerpo monoclonal correspondiente que se une a FLT3, las proteínas multiespecíficas ofrecen una ventaja en el direccionamiento de células tumorales que expresan niveles medios y bajos de FLT3.

III. Aplicaciones terapéuticas

La invención proporciona métodos para tratar el cáncer mediante el uso de una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente. Los métodos pueden utilizarse para tratar una variedad de cánceres que expresan FLT3. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia de células T, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica y leucemia de células pilosas.

En algunas otras modalidades, el cáncer es cáncer de mama, de ovario, de esófago, de vejiga o gástrico, carcinoma de conductos salivales, carcinomas de conductos salivales, adenocarcinoma de pulmón o formas agresivas de cáncer uterino, tal como el carcinoma de endometrio seroso uterino.

En algunas otras modalidades, el cáncer es cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer testicular o cáncer uterino. En aun otras

5 modalidades, el cáncer es un carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, melanoma, neuroblastoma, sarcoma (p. ej. un angiosarcoma o condrosarcoma), cáncer de laringe, cáncer de parótida, cáncer de vías biliares, cáncer de tiroides, melanoma lentiginoso acral, queratosis actínica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adenoide quístico, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, cáncer del

10 canal anal, cáncer de ano, cáncer anorrectal, tumor astrocítico, carcinoma de la glándula de bartolino, carcinoma de células basales, cáncer biliar, cáncer de hueso, cáncer de médula ósea, cáncer bronquial, carcinoma de la glándula bronquial, carcinoide, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma del plexo coroideo, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, carcinoma de células claras, cáncer de tejido conectivo, cistoadenoma, cáncer del

15 sistema digestivo, cáncer de duodeno, cáncer del sistema endócrino, tumor del seno endodérmico, hiperplasia endometrial, sarcoma de estroma endometrial, adenocarcinoma endometriode, cáncer de células endoteliales, cáncer de epéndimo, cáncer de células epiteliales, sarcoma de Ewing, cáncer de ojo y órbita, cáncer genital femenino, hiperplasia nodular focal, cáncer de vesícula, cáncer de antro gástrico, cáncer de fondo gástrico, gastrinoma, glioblastoma, glucagonoma, cáncer de

20 corazón, hemangiblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, cáncer hepatobiliar, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de íleon, insulinooma, neoplasia intraepitelial, neoplasia de células escamosas interepitelial, cáncer de las vías biliares intrahepáticas, carcinoma de células escamosas invasivo, cáncer de yeyuno, cáncer de articulaciones, sarcoma de Kaposi, cáncer pélvico, carcinoma de células grandes,

25 cáncer de intestino grueso, liomiosarcoma, melanomas de lentigo maligno, linfoma, cáncer genital masculino, melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, cáncer de meninges, cáncer mesotelial, carcinoma metastásico, cáncer de boca, carcinoma mucoepidermoide, mieloma múltiple, cáncer de músculo, cáncer de cavidad nasal, cáncer de sistema nervioso, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, cáncer de piel no epitelial,

30 linfoma no Hodgkin, carcinoma de células pequeñas, cáncer oligodendrogial, cáncer de la cavidad oral, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores pituitarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer del sistema respiratorio, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, cáncer de los senos paranasales, cáncer de piel, carcinoma de células pequeñas, cáncer

de intestino delgado, cáncer de músculo liso, cáncer de tejidos blandos, tumor secretor de somatostatina, cáncer de médula espinal, carcinoma de células escamosas, cáncer de músculo estriado, cáncer submesotelial, melanoma de extensión superficial, leucemia de células T, cáncer de lengua, carcinoma no diferenciado, cáncer de uréter, cáncer de uretra, cáncer de vejiga urinaria, 5 cáncer del sistema urinario, cáncer cervical uterino, cáncer de cuerpo uterino, melanoma uveal, cáncer vaginal, carcinoma verrugoso, VIPoma, cáncer de vulva, carcinoma bien diferenciado o tumor de Wilms.

En algunas otras modalidades, el cáncer a tratar es linfoma no Hodgkin, tal como linfoma de células B o un linfoma de células T. En determinadas modalidades, el linfoma no Hodgkin es un linfoma de 10 células B, tal como un linfoma difuso de células grandes B, linfoma mediastínico primario de células B, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, linfoma de células B de la zona marginal, linfoma de células B de la zona marginal extranodal, linfoma de células B de la zona marginal nodal, linfoma de células B de la zona marginal esplénico, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico, leucemia de células pilosas o linfoma primario del sistema nervioso central (SNC).

15 En determinadas otras modalidades, el linfoma no Hodgkin es un linfoma de células T, tal como un linfoma linfoblástico del precursor T, linfoma de células T periférico, linfoma de células T cutáneo, linfoma de células T angioinmunoblástico, linfoma citolítico/de células T extranodal, linfoma de células T asociado a enteropatía, linfoma subcutáneo de células T paniculítico, linfoma de células grandes anaplásico o linfoma de células T periférico.

20 **IV. Terapia de combinación**

Otro aspecto de la invención proporciona una terapia de combinación. Una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente puede utilizarse en combinación con agentes terapéuticos adicionales para tratar el cáncer.

25 Agentes terapéuticos ilustrativos que pueden utilizarse como parte de una terapia de combinación en el tratamiento del cáncer incluyen, por ejemplo, radiación, mitomicina, tretinoína, ribomustina, gemcitabina, vincristina, etopósido, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorubicina, carboquone, pentostatina, nitacrina, zinostatina, cetorelix, letrozol, raltitrexed, daunorubicina, fadrozol, fotemustina, timalfasina, sobuzoxano, nedaplatin, citarabina, bicalutamida, vinorelbina, vesnarinona, 30 aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptinio, ketanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vindesina, flutamida, drogenil, butocina, carmofur, razoxano, sizofilano, carboplatino, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanil, levamisol, tenipósido, improsulfán, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona, mepitiostano,

epitiostanol, formestano, interferón-alfa, interferón-2 alfa, interferón-beta, interferón-gamma (IFN- γ), factor 1 estimulante de colonias, factor 2 estimulante de colonias, denileukin diftotox, interleucina-2, factor liberador de la hormona luteinizante y variaciones de los agentes mencionados anteriormente que pueden presentar unión diferencial a su receptor análogo y semivida sérica aumentada o disminuida.

Una clase adicional de agentes que pueden utilizarse como parte de una terapia de combinación en el tratamiento del cáncer son los inhibidores de puntos de control inmunitarios. Inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen agentes que inhiben uno o más de (i) antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), (ii) proteína 1 de muerte celular programada (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 y (vii) TIM3. El inhibidor de CTLA4 ipilimumab ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento del melanoma.

Aun otros agentes que pueden utilizarse como parte de una terapia de combinación en el tratamiento del cáncer son agentes de anticuerpos monoclonales que se dirigen a dianas diferentes a puntos de control inmunitarios (p. ej. Herceptin) y agentes no citotóxicos (p. ej. inhibidores de la tirosina quinasa).

Aun otras categorías de agentes contra el cáncer incluyen, por ejemplo: (i) un inhibidor seleccionado de un inhibidor de ALK, un inhibidor de ATR, un antagonista de A2A, un inhibidor de reparación por escisión de bases, un inhibidor de la tirosina quinasa Bcr-Abl, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton, un inhibidor de CDC7, un inhibidor de CHK1, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, un inhibidor de DNA-PK, un inhibidor de DNA-PK y mTOR, un inhibidor de DNMT1, un inhibidor de DNMT1 más 2-cloro-deoxiadenosina, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de la vía de señalización de Hedgehog, un inhibidor de IDO, un inhibidor de JAK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de MEK, un inhibidor de MELK, un inhibidor de MTH1, un inhibidor de PARP, un inhibidor de la fosfoinositida 3-quinasa, un inhibidor de PARP1 y DHODH, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de la Topoisomerasa-II, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de VEGFR y un inhibidor de WEE1; (ii) un agonista de OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25, o ICOS; y (iii) una citocina seleccionada de IL-12, IL-15, GM-CSF, y G-CSF.

Las proteínas de la invención también pueden utilizarse como un complemento a la extirpación quirúrgica de la lesión primaria.

La cantidad de proteína de unión multiespecífica y agente terapéutico adicional y el tiempo relativo de administración pueden seleccionarse para lograr un efecto terapéutico combinado deseado. Por ejemplo, cuando se administra una terapia de combinación a un paciente que necesita dicha administración, los agentes terapéuticos en la combinación, o una composición farmacéutica o composiciones que comprenden los agentes terapéuticos, pueden administrarse en cualquier orden tal como, por ejemplo, consecutivamente, conjuntamente, de manera conjunta, simultáneamente y similares. Además, por ejemplo, una proteína de unión multiespecífica puede administrarse durante un tiempo cuando el o los agentes terapéuticos adicionales emplean sus efectos terapéuticos o profilácticos, o *vice versa*.

V. Composiciones farmacéuticas

La presente descripción también presenta composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína descrita en la presente. La composición puede formularse para su uso en diversos sistemas de administración de fármacos. Uno o más excipientes o portadores fisiológicamente aceptables también pueden incluirse en la composición para una formulación adecuada. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa, 17^a edición 1985. Por una breve reseña respecto a los métodos para la administración de fármacos véase, *p.ej.*, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

La formulación de administración de fármacos intravenosa de la presente descripción puede estar contenida en una bolsa, una pluma o una jeringa. En determinadas modalidades, la bolsa puede conectarse a un canal que comprende un tubo y/o una aguja. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación liofilizada o una formulación líquida. En determinadas modalidades, la formulación puede estar secada por congelación (liofilizada) y contenida en alrededor de 12-60 viales. En determinadas modalidades, la formulación puede estar secada por congelación y 45 mg de la formulación secada por congelación puede estar contenida en un vial. En determinadas modalidades, la formulación secada por congelación de alrededor de 40 mg a alrededor de 100 mg puede estar contenida en un vial. En determinadas modalidades, la formulación secada por congelación de 12, 27 o 45 viales se combinan para obtener una dosis terapéutica de la proteína en la formulación de fármaco intravenosa. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como alrededor de 250 mg/vial a alrededor de 1000 mg/vial. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y

almacenarse como alrededor de 600 mg/vial. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como alrededor de 250 mg/vial.

La proteína podría existir en una formulación farmacéutica acuosa líquida que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína en una solución amortiguadora que forma una formulación.

5

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden filtrarse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso en la forma en que se encuentran o liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente se encontrará entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y más preferentemente entre 7 y 8, tal como 7 a 7.5. Las composiciones resultantes en forma sólida pueden empacarse en unidades de dosis únicas múltiples, cada una contiene una cantidad fija del agente o agentes mencionados anteriormente. La composición en forma sólida también puede empacarse en un recipiente para una cantidad flexible.

15

En determinadas modalidades, la presente descripción proporciona una formulación con una vida útil en almacenaje extendida que incluye la proteína de la presente descripción, en combinación con manitol, ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio, fosfato de sodio dihidrato, sodio dihidrogenofosfato dihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, agua e hidróxido de sodio.

20

En determinadas modalidades, se prepara una formulación acuosa que incluye la proteína de la presente descripción en una solución amortiguadora de pH. El amortiguador de esta invención puede tener un pH que oscile de alrededor de 4 a alrededor de 8, p. ej. de alrededor de 4.5 a alrededor de 6.0 o de alrededor de 4.8 a alrededor de 5.5 o puede tener un pH de alrededor de 5.0 a alrededor de 5.2. También se pretende que los rangos intermedios a los pH mencionados anteriormente sean parte de la presente descripción. Por ejemplo, se pretende que se incluyan los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. Los ejemplos de amortiguadores que controlarán el pH dentro de este rango incluyen el acetato (*p.ej.*, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros amortiguadores de ácidos orgánicos.

25

En determinadas modalidades, la formulación incluye un sistema amortiguador que contiene citrato y fosfato para mantener el pH en un rango de alrededor de 4 a alrededor de 8. En determinadas modalidades, el rango de pH puede ser de alrededor de 4.5 a alrededor de 6.0, o de alrededor de

un pH de 4.8 a alrededor de 5.5, o en un rango de pH de alrededor de 5.0 a alrededor de 5.2. En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio, fosfato de sodio dihidrato y/o sodio dihidrogenofosfato dihidrato. En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye alrededor de 1.3 mg/ml de ácido cítrico (p. ej. 1.305 mg/ml), alrededor de 0.3 mg/ml de citrato de sodio (p. ej. 0.305 mg/ml), alrededor de 1.5 mg/ml de fosfato de sodio dihidrato (p. ej. 1.53 mg/ml), alrededor de 0.9 mg/ml de sodio dihidrogenofosfato dihidrato (p. ej. 0.86) y alrededor de 6.2 mg/ml de cloruro de sodio (p. ej. 6.165 mg/ml). En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye 1-1.5 mg/ml de ácido cítrico, 0.25 a 0.5 mg/ml de citrato de sodio, 1.25 a 1.75 mg/ml de fosfato de sodio dihidrato, 0.7 a 1.1 mg/ml de sodio dihidrogenofosfato dihidrato, y 6.0 a 6.4 mg/ml de cloruro de sodio. En determinadas modalidades, el pH de la formulación se modifica con hidróxido de sodio.

Un poliol, que actúa como un tonificante y puede estabilizar el anticuerpo, también puede incluirse en la formulación. El poliol se agrega a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. En determinadas modalidades, la formulación acuosa puede ser isotónica. La cantidad de poliol agregada también puede alterarse con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, puede agregarse una menor cantidad de un monosacárido (*p.ej.*, manitol) en comparación con un disacárido (tal como la trehalosa). En determinadas modalidades, el poliol que puede utilizarse en la formulación como un agente de tonicidad es manitol. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 5 a alrededor de 20 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 7.5 mg/ml a 15 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 10-14 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 12 mg/ml. En determinadas modalidades, el poliol sorbitol puede incluirse en la formulación.

También puede agregarse un detergente o tensioactivo a la formulación. Los ejemplos de detergentes incluyen detergentes tales como polisorbato (*p.ej.*, polisorbato 20, 80, etc.) o poloxámeros (*p.ej.*, poloxámero 188). La cantidad de detergente agregada es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. En determinadas modalidades, la formulación puede incluir un tensioactivo que es un polisorbato. En determinadas modalidades, la formulación puede contener el detergente polisorbato 80 o Tween 80. Tween 80 es un término utilizado para describir monooleato de polioxietilen(20)sorbitano (véase Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4.º

ed., 1996). En determinadas modalidades, la formulación puede contener entre alrededor de 0.1 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml de polisorbato 80 o entre alrededor de 0.5 mg/ml y alrededor de 5 mg/ml. En determinadas modalidades, alrededor de 0.1 % de polisorbato 80 puede agregarse en la formulación.

5

En modalidades, el producto de la proteína de la presente descripción se formula como una formulación líquida. La formulación líquida puede presentarse a una concentración de 10 mg/ml en el vial de tipo I 50R de la USP/Ph Eur cerrado con un tapón de caucho y sellado con un cierre de sello de aluminio corrugado. El tapón puede estar hecho de elastómero que cumple con la USP y Ph Eur. En determinadas modalidades los viales pueden llenarse con 61.2 ml de la solución de producto de la proteína para permitir un volumen de extracción de 60 ml. En determinadas modalidades, la formulación líquida puede diluirse con solución salina al 0.9 %.

10

En determinadas modalidades, la formulación líquida de la descripción puede prepararse como una solución de concentración de 10 mg/ml en combinación con un azúcar en niveles estabilizantes. En determinadas modalidades, la formulación líquida puede prepararse en un portador acuoso. En determinadas modalidades, puede agregarse un estabilizante en una cantidad no mayor que la que puede resultar en una viscosidad no deseable o no adecuada para administración intravenosa. En determinadas modalidades, el azúcar puede ser disacáridos, p. ej. sacarosa. En determinadas modalidades, la formulación líquida también puede incluir uno o más de un agente amortiguador, un tensioactivo y un conservante.

15

20

En determinadas modalidades, el pH de la formulación líquida puede fijarse mediante la adición de un ácido y/o base farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico. En determinadas modalidades, la base puede ser hidróxido de sodio.

25

Además de la agregación, la desamidación es una variante del producto común de péptidos y proteínas que puede ocurrir durante la fermentación, clarificación de cultivo/células, purificación, almacenamiento de la sustancia farmacológica/producto farmacológico y durante el análisis de muestras. La desamidación es la pérdida de NH_3 de una proteína que forma un intermediario de succinimida que puede experimentar hidrólisis. El intermediario de succinimida resulta en una disminución de la masa de 17 daltons del péptido original. La hidrólisis posterior resulta en un aumento de la masa de 18 daltons. El aislamiento del intermediario de succinimida es difícil debido

30

a la inestabilidad en condiciones acuosas. Como tal, la desamidación es normalmente detectable como un aumento de masa de 1 dalton. La desamidación de una asparagina resulta en ácido aspártico o isoaspártico. Los parámetros que afectan la tasa de desamidación incluyen pH, temperatura, constante dieléctrica del solvente, fuerza iónica, secuencia primaria, conformación de polipéptido local y estructura terciaria. Los residuos de aminoácido adyacentes a Asn en la cadena de péptidos afectan las tasas de desamidación. Gly y Ser que siguen a una Asn en las secuencias de proteínas resulta en una mayor susceptibilidad a la desamidación.

En determinadas modalidades, la formulación líquida de la presente descripción puede preservarse en condiciones de pH y humedad para prevenir la desamidación del producto de proteína.

El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida. Portadores ilustrativos incluyen agua estéril para la inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, una solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

Puede agregarse opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de múltiples usos (múltiples dosis).

Las formulaciones intravenosas (IV) pueden ser la vía de administración preferida en casos particulares, tal como cuando un paciente está en el hospital luego de un trasplante recibiendo todos los fármacos a través de la vía IV. En determinadas modalidades, la formulación líquida se diluye con una solución de cloruro de sodio al 0.9 % antes de la administración. En determinadas modalidades, el producto farmacológico diluido para inyección es isotónico y adecuado para la administración mediante infusión intravenosa.

En determinadas modalidades, una sal o componentes amortiguadores pueden agregarse en una cantidad de 10 mM-200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y se originan de diversos ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguador de fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser glicinato, carbonato, amortiguadores de citrato, en cuyo caso, iones de sodio, potasio o amonio pueden funcionar como contraiones.

Puede agregarse opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de múltiples usos (múltiples dosis).

5

El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida. Portadores ilustrativos incluyen agua estéril para la inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, una solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

10

La proteína de la presente descripción podría existir en una formulación liofilizada que incluye las proteínas y un lioprotector. El lioprotector puede ser azúcar, p. ej. disacáridos. En determinadas modalidades, el lioprotector puede ser sacarosa o maltosa. La formulación liofilizada también puede incluir uno o más de un agente amortiguador, un tensioactivo, un agente espesante y/o un conservante.

15

La cantidad de sacarosa o maltosa útil para la estabilización del producto farmacológico liofilizado puede ser en una relación de peso de al menos 1:2 de proteína respecto a sacarosa o maltosa. En determinadas modalidades, la relación de peso de la proteína respecto a sacarosa o maltosa puede ser de 1:2 a 1:5.

20

En determinadas modalidades, el pH de la formulación, antes de la liofilización, puede fijarse mediante la adición de un ácido y/o base farmacéuticamente aceptable. En determinadas modalidades, el ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico. En determinadas modalidades, la base farmacéuticamente aceptable puede ser hidróxido de sodio.

25

Antes de la liofilización, el pH de la solución que contiene la proteína de la presente descripción puede ajustarse entre 6 a 8. En determinadas modalidades, el rango de pH para el producto farmacológico liofilizado puede ser de 7 a 8.

30

En determinadas modalidades, una sal o componentes amortiguadores pueden agregarse en una cantidad de 10 mM-200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y se originan de diversos ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas “formadores

de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguador de fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser glicinato, carbonato, amortiguadores de citrato, en cuyo caso, iones de sodio, potasio o amonio pueden funcionar como contraiones.

5 En determinadas modalidades, puede agregarse un "agente espesante". Un "agente espesante" es un compuesto que agrega masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierto). Los agentes espesantes de ejemplo incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol. Las formulaciones liofilizadas de la presente invención pueden
10 contener dichos agentes espesantes.

Puede agregarse opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de múltiples usos (múltiples dosis).

15 En determinadas modalidades, el producto farmacológico liofilizado puede constituirse con un portador acuoso. El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (p. ej. seguro y no tóxico para administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida, luego de la liofilización. Diluyentes ilustrativos incluyen agua estéril para la
20 inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, una solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

En determinadas modalidades, el producto farmacológico liofilizado de la presente descripción se reconstituye con agua estéril para inyección, USP (SWFI) o inyección de cloruro de sodio al 0.9 %, USP. Durante la reconstitución, el polvo liofilizado se disuelve en una solución.

25

En determinadas modalidades, el producto de proteína liofilizado de la presente descripción está constituido en alrededor de 4.5 ml de agua para inyección y diluido con solución salina al 0.9 % (solución de cloruro de sodio).

30

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variar de manera de obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de

administración particular, sin ser tóxico para el paciente.

La dosis específica puede ser una dosis uniforme para cada paciente, por ejemplo, 50-5000 mg de proteína. De manera alternativa, una dosis del paciente puede adecuarse al peso corporal aproximado o área de superficie del paciente. Otros factores para determinar la dosificación adecuada pueden incluir la enfermedad o afección a tratar o prevenir, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y la edad, sexo y condición médica del paciente. Los expertos en la técnica, de forma rutinaria, realizan mayores refinamientos de los cálculos necesarios para determinar la dosificación adecuada para el tratamiento, especialmente ante la información de dosificación y ensayos descritos en la presente. La dosificación también se puede determinar a través del uso de ensayos conocidos para determinar dosificaciones utilizadas junto con datos dependientes de la dosis apropiados. Una dosificación del paciente individual puede ajustarse a medida que se monitorea el avance de la enfermedad. Los niveles en sangre de la construcción o complejo como diana en un paciente pueden medirse para ver si la dosificación debe ajustarse para alcanzar o mantener una concentración eficaz. Se puede utilizar la farmacogenómica para determinar qué construcciones y/o complejos como dianas y dosificaciones de estos, tienen más posibilidades de ser eficaces para un individuo dado (Schmitz *et ál.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et ál.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

En general, las dosificaciones basadas en el peso corporal son de alrededor de 0.01 µg a alrededor de 100 mg por kg de peso corporal, tal como alrededor de 0.01 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 50 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.01 µg a alrededor de 0.1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0.1 µg a alrededor de 1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso

corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 50 µg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg a alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 10 µg a alrededor de 50 µg/kg de peso corporal, alrededor de 50 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 100 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 100 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 100 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 100 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 mg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 mg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 1 mg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 mg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 10 mg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 50 mg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal.

Las dosis pueden ser dadas una vez o más veces por día, por semana, por mes o por año o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente las frecuencias de repetición para la dosificación en función de los tiempos de residencia y las concentraciones de la construcción o complejo como dianas en fluidos o tejidos corporales. La administración de la presente invención podría ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, intracavitaria, mediante perfusión a través de un catéter o mediante inyección intralesional directa. Esta puede administrarse una vez o más veces por día, una vez o más veces por semana, una vez o más veces por mes y una vez o más veces por año.

La descripción anterior describe múltiples aspectos y modalidades de la invención. La solicitud de patente contempla de forma específica todas las combinaciones y cambios de los aspectos y las modalidades.

EJEMPLOS

La invención, que se ha descrito en términos generales, se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente para ilustrar determinados aspectos y modalidades de la presente invención y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1- dominios de unión a NKG2D se unen a NKG2D

Dominios de unión a NKG2D se unen a NKG2D recombinante purificado

Las secuencias de ácido nucleico de ectodominios de NKG2D humano, de ratón o de cynomolgus
 5 fueron fusionadas con secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de Fc de IgG1 humana
 e introducidas en célula de mamífero a ser expresadas. Luego de la purificación, las proteínas de
 fusión NKG2D-Fc se absorbieron en pocillos de microplacas. Luego de bloquear los pocillos con
 albúmina de suero bovino para evitar unión no específica, los dominios de unión a NKG2D se
 titularon y se agregaron a los pocillos preadsorbidos con proteínas de fusión NKG2D-Fc. La unión
 10 del anticuerpo primario se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario que se conjugó con
 peroxidasa de rábano y reconoce específicamente una cadena ligera kappa humana para evitar la
 reactividad cruzada de Fc. 3,3',5,5'- Tetrametilbencidina (TMB), un sustrato para la peroxidasa de
 rábano, se agregó a los pocillos para visualizar la señal de unión, cuya absorbancia se midió a 450
 nm y se corrigió a 540 nM. Se agregó un clon de dominio de unión a NKG2D, un control de isotipo
 15 o un control positivo (que comprenden los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera
 seleccionados de las SEQ ID NO:101-104, o clones de NKG2D antiratón MI-6 y CX-5 disponibles
 en eBioscience) a cada pocillo.

El control de isotipo mostró unión mínima a las proteínas de NKG2D-Fc recombinantes, mientras
 20 que el control positivo se unió fuertemente a los antígenos recombinantes. Los dominios de unión a
 NKG2D producidos por todos los clones demostraron la unión en todas las proteínas de NKG2D-Fc
 recombinantes humanas, de ratón y de cynomolgus, aunque con afinidades variables de clon en
 clon. Generalmente, cada clon anti-NKG2D está unido a NKG2D-Fc recombinante humano (Figura
 3) y de cynomolgus (Figura 4) con afinidad similar, pero con menor afinidad al NKG2D-Fc
 25 recombinante de ratón (Figura 5).

Dominios de unión a NKG2D se unen a células que expresan NKG2D

Las líneas celulares de linfoma de ratón EL4 se modificaron para expresan receptores de antígenos
 quiméricos de dominio de señalización NKG2D-CD3 zeta humano o de ratón. Se utilizó un clon de
 30 unión a NKG2D, un control de isotipo o un control positivo a una concentración de 100 nM para teñir
 NKG2D extracelular expresado en las células EL4. La unión de anticuerpo se detectó mediante el
 uso de anticuerpos secundarios de IgG humana conjugados con un fluoróforo. Las células se
 analizaron por citometría de flujo y se calculó el múltiplo del fondo (FOB) utilizando la intensidad

promedio de fluorescencia (MFI) de células que expresan NKG2D en comparación con células EL4 precursoras.

Los dominios de unión a NKG2D producidos por todos los clones están unidos a células EL4 que expresan NKG2D humano y de ratón. Los anticuerpos de control positivo (que comprenden dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera seleccionados de las SEQ ID NO:101-104, o clones de NKG2D antirratón MI-6 y CX-5 disponibles en eBioscience) proporcionaron la mejor señal de unión de FOB. La afinidad de unión a NKG2D para cada clon fue similar entre células que expresan NKG2D humano (Figura 6) y de ratón (Figura 7) NKG2D.

Ejemplo 2- dominios de unión a NKG2D bloquean la unión de ligando natural al NKG2D

Competencia con ULBP-6

Las proteínas de NKG2D-Fc humanas recombinantes fueron adsorbidas en pocillos de una microplaca y los pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino para reducir la unión no específica. Se agregó una concentración de saturación de ULBP-6-His-biotina a los pocillos, seguido por la adición de los clones de dominio de unión a NKG2D. Luego de una incubación durante 2 horas, los pocillos se lavaron y la ULBP-6-His-biotina que se mantuvo unida a los pocillos recubiertos con NKG2D-Fc se detectó mediante estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano y sustrato TMB. La absorbancia se midió a 450 nM y se corrigió 540 nM. Luego de eliminar el fondo, la unión específica de dominios de unión a NKG2D a las proteínas de NKG2D-Fc se calculó a partir del porcentaje de ULBP-6-His-biotina que se bloqueó de la unión a las proteínas de NKG2D-Fc en pocillos. El anticuerpo de control positivo (que comprenden dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera seleccionados de las SEQ ID NO:101-104) y diversos dominios de unión a NKG2D bloquearon la unión de ULBP-6 al NKG2D, mientras que el control de isotipo mostró poca competencia con ULBP-6 (Figura 8).

La secuencia de ULBP-6 está representada por la SEQ ID NO:108
 MAAAIPALLLCLPLLFLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVDEKTFLLHYDC
 GNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAE
 GHSSGSWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLE
 DFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRATATTLLCCLLIILPCFILPGI (SEQ ID NO:108)

Competencia con MICA

Las proteínas de MICA-Fc humanas recombinantes fueron adsorbidas en pocillos de una microplaca y los pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino para reducir la unión no específica. Se agregó NKG2D-Fc-biotina a pocillos seguido por dominios de unión a NKG2D. Luego de la incubación y lavado, NKG2D-Fc-biotina que permaneció unida a pocillos recubiertos con MICA-Fc se detectó mediante el uso de estreptavidina-HRP y sustrato TMB. La absorbancia se midió a 450 nM y se corrigió a 540 nM. Luego de eliminar el fondo, la unión específica de dominios de unión a NKG2D a las proteínas de NKG2D-Fc se calculó a partir del porcentaje de NKG2D-Fc-biotina que se bloqueó de la unión a los pocillos recubiertos con MICA-Fc. El anticuerpo de control positivo (que comprende dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera seleccionados de las SEQ ID NO:101-104) y diversos dominios de unión a NKG2D bloquearon la unión de MICA al NKG2D, mientras que el control de isotipo mostró poca competencia con MICA (Figura 9).

Competencia con Rae-1 delta

Rae-1delta-Fc de ratón recombinante (obtenida de R&D Systems) fue adsorbida en pocillos de una microplaca y los pocillos se bloquearon con albúmina de suero bovino para reducir la unión no específica. Se agregó NKG2D-Fc-biotina de ratón a los pocillos seguido por dominios de unión a NKG2D. Luego de la incubación y lavado, NKG2D-Fc-biotina que permaneció unida a pocillos recubiertos con Rae-1delta-Fc se detectó mediante el uso de estreptavidina-HRP y sustrato TMB. La absorbancia se midió a 450 nM y se corrigió a 540 nM. Luego de eliminar el fondo, la unión específica de dominios de unión a NKG2D a las proteínas de NKG2D-Fc se calculó a partir del porcentaje de NKG2D-Fc-biotina que se bloqueó de la unión a los pocillos recubiertos con Rae-1delta-Fc. El control positivo (que comprende dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera seleccionados de las SEQ ID NO:101-104, o clones de NKG2D antirratón MI-6 y CX-5 disponibles en eBioscience) y diversos clones de dominio de unión a NKG2D bloquearon la unión de Rae-1 delta a NKG2D de ratón, mientras que el anticuerpo de control de isotipo mostró poca competencia con Rae-1delta (Figura 10).

Ejemplo 3- clones de dominios de unión a NKG2D activan a NKG2D

Las secuencias de ácido nucleico de NKG2D humano y de ratón se fusionaron a secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio de señalización CD3 zeta para obtener construcciones de receptores de antígenos quiméricos (CAR). Las construcciones de NKG2D-CAR luego se clonaron

en un vector de retrovirus mediante el uso de un ensamblaje de Gibson y se transfectaron en células expi293 para la producción de retrovirus. Las células EL4 se infectaron con virus que contienen NKG2D-CAR junto con 8 pg/ml de polibreno. 24 horas luego de la infección, los niveles de expresión de NKG2D-CAR en las células EL4 se analizaron por citometría de flujo y se seleccionaron los clones
5 que expresan niveles altos de NKG2D-CAR en la superficie celular.

Para determinar si los dominios de unión a NKG2D activan a NKG2D, fueron adsorbidos en pocillos de una microplaca y las células NKG2D-CAR EL4 se cultivaron en pocillos recubiertos con fragmentos de anticuerpos durante 4 horas en presencia de brefeldin-A y monensina. La producción
10 de TNF- α intracelular, un indicador para la activación de NKG2D, fue analizada mediante citometría de flujo. El porcentaje de células positivas para TNF- α se normalizó a las células tratadas con el control positivo. Todos los dominios de unión a NKG2D activaron NKG2D humano (Figura 11) y de ratón (Figura 12).

15 **Ejemplo 4- dominios de unión a NKG2D activan células NK**

Células NK humanas primarias

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocitarias de
20 sangre periférica humana mediante el uso de centrifugación por gradiente de densidad. Las células NK (CD3⁻ CD56⁺) se aislaron mediante selección negativa con perlas magnéticas de las PBMC y la pureza de las células NK aisladas fue normalmente >95 %. Las células NK aisladas luego se cultivaron en medios que contienen 100 ng/ml de IL-2 durante 24-48 horas antes de ser transferidas a los pocillos de una microplaca a la cual se adsorbieron los dominios de unión a NKG2D y se
25 cultivaron en los medios que contienen anticuerpo anti-CD107a conjugado con fluoróforo, brefeldin-A y monensina. Luego del cultivo, las células NK se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD3, CD56 e IFN- γ conjugados con fluoróforo. La tinción de CD107a e IFN- γ se analizó en células CD3⁻ CD56⁺ para evaluar la activación de células NK. El aumento en las células dobles positivas de CD107a/IFN- γ es indicativo de una mejor activación de células NK a través del
30 acoplamiento de dos receptores de activación en lugar de un receptor. Los dominios de unión a NKG2D y el control positivo (p. ej., dominio variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO:101 o la SEQ ID NO:103 y un dominio variable de cadena ligera representado por la SEQ ID NO:102 o la SEQ ID NO:104) mostraron un mayor porcentaje de células NK convertidas en CD107a⁺ e IFN- γ ⁺ que el control de isotipo (la Figura 13 y Figura 14 representan datos de dos experimentos

independientes, cada uno utilizando PBMC de donantes diferentes para la preparación de células NK).

Células NK de ratón primarias

- 5 Se obtuvieron bazo de ratones C57B1/6 y se trituraron mediante un filtro para células de 70 μ m para obtener una única suspensión de células. Las células se precipitaron y se resuspendieron en amortiguador de lisis de ACK (obtenido de Thermo Fisher Scientific #A1049201; cloruro de amonio 155 mM, bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 0.01 mM) para eliminar los eritrocitos. Las células remanentes se cultivaron con 100 ng/ml de hIL-2 durante 72 horas antes de ser cultivadas y
- 10 preparadas para el aislamiento de células NK. Luego, las células NK (CD3⁺NK1.1⁺) se aislaron de células de bazo mediante el uso de una técnica de depleción negativa con perlas magnéticas con una pureza normalmente >90 %. Las células NK purificadas se cultivaron en medios que contienen 100 ng/ml de mIL-15 durante 48 horas antes de ser transferidas a los pocillos de una microplaca a la cual se adsorbieron los dominios de unión a NKG2D y se cultivaron en los medios que contienen
- 15 anticuerpo anti-CD107a conjugado con fluoróforo, brefeldin-A y monensina. Luego del cultivo en pocillos recubiertos con dominio de unión a NKG2D, las células NK se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD3, NK1.1 e IFN- γ conjugados con fluoróforo. La tinción de CD107a e IFN- γ se analizó en células CD3⁺NK1.1⁺ para evaluar la activación de células NK. El aumento en las células dobles positivas de CD107a/IFN- γ es indicativo de una mejor
- 20 activación de células NK a través del acoplamiento de dos receptores de activación en lugar de un receptor. Los dominios de unión a NKG2D y el control positivo (seleccionado de clones de NKG2D antirratón MI-6 y CX-5 disponibles en eBioscience) mostraron un mayor porcentaje de células NK convertidas en CD107a⁺ e IFN- γ ⁺ que el control de isotipo (la Figura 15 y la Figura 16 representan datos de dos experimentos independientes, cada uno utilizando un ratón diferente para la
- 25 preparación de células NK).

Ejemplo 5- dominios de unión a NKG2D permiten la citotoxicidad de células tumorales diana

- Los ensayos de activación de células NK primarias humanas y de ratón demostraron un aumento
- 30 en los marcadores de citotoxicidad sobre células NK luego de la incubación con dominios de unión a NKG2D. Para enfocarse si esto se traduce en un aumento en la lisis de células tumorales, se utilizó un ensayo basado en células donde cada dominio de unión a NKG2D se desarrolló en un anticuerpo monoespecífico. La región Fc se utilizó como un brazo de direccionamiento, mientras que la región Fab (dominio de unión a NKG2D) actuó como otro brazo de direccionamiento para activar a las

células NK. Las células THP-1, que son de origen humano y expresan niveles altos de receptores de Fc, se utilizaron como una diana tumoral y se utilizó el kit de citotoxicidad DELFIA de Perkin Elmer. Las células THP-1 fueron etiquetadas con el reactivo BATDA y se resuspendieron a 10^5 /ml en medios de cultivo. Las células THP-1 etiquetadas luego se combinaron con anticuerpos NKG2D y se aislaron las células NK de ratón en pocillos de una placa de microtitulación a 37 °C durante 3 horas. Luego de la incubación, se eliminaron 20 μ L del sobrenadante del cultivo, se mezclaron con 200 μ L de solución de Europio y se incubaron con agitación durante 15 minutos en la oscuridad. Se midió la fluorescencia en el tiempo mediante un lector de placa PheraStar equipado con un módulo de fluorescencia resuelta por tiempo (Excitación 337 nm, Emisión 620 nm) y se calculó una lisis específica de acuerdo con las instrucciones del kit.

El control positivo, ULBP-6-un ligando natural para NKG2D, mostró un aumento en la lisis específica de células diana THP-1 mediante células NK de ratón. Los anticuerpos de NKG2D también aumentaron la lisis específica de células diana THP-1, mientras que el anticuerpo de control de isotipo mostró lisis específica reducida. La línea punteada indica lisis específica de células THP-1 mediante células NK de ratón sin anticuerpo agregado (Figura 17).

Ejemplo 6- anticuerpos de NKG2D muestran alta termoestabilidad

Las temperaturas de fusión de dominios de unión a NKG2D fueron analizadas mediante el uso de fluorimetría diferencial de barrido. Las temperaturas de fusión aparentes extrapoladas son altas respecto a anticuerpos IgG1 típicos (Figura 18).

Ejemplo 7- activación sinérgica de células NK humanas mediante reticulación de NKG2D y CD16.

Ensayo de activación de células NK humanas primarias

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocitarias de sangre periférica humana mediante el uso de centrifugación por gradiente de densidad. Las células NK fueron purificadas a partir de las PBMC utilizando perlas magnéticas negativas (StemCell # 17955). Las células NK fueron >90 % CD3⁻ CD56⁺ según como se determinó mediante citometría de flujo. Luego se expandieron las células 48 horas en medios que contienen 100 ng/ml de hIL-2 (Peprotech #200-02) antes del uso en ensayos de activación. Los anticuerpos fueron recubiertos en una placa de fondo plano de 96 pocillos a una concentración de 2 μ g/ml (anti-CD16, Biolegend #

302013) y 5 µg/ml (anti-NKG2D, R&D #MAB139) en 100 µL de PBS estéril durante la noche a 4 °C seguido por lavado completo de pocillos para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la evaluación de la degranulación, las células NK activadas por IL-2 fueron resuspendidas a 5×10^5 células/mL en medios de cultivo complementados con 100 ng/ml de IL-2 humana (hIL2) y 1 µg/ml de mAb anti-CD107a conjugado con APC (Biolegend # 328619). Luego se agregaron 1×10^5 células/pocillo en placas recubiertas con anticuerpo. Los inhibidores del transporte de proteínas Brefeldin A (BFA, Biolegend # 420601) y Monensina (Biolegend # 420701) se agregaron a una dilución final de 1:1000 y 1:270, respectivamente. Las células colocadas en placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C en 5 % de CO₂. Para la tinción intracelular de IFN-γ, las células NK fueron etiquetadas con mAb anti-CD3 (Biolegend #300452) y anti-CD56 (Biolegend # 318328), y posteriormente fijadas, permeabilizadas y etiquetadas con mAb anti-IFN-γ (Biolegend # 506507). Las células NK fueron analizadas para la expresión de CD107a e IFN-γ mediante citometría de flujo luego de la activación en células CD56⁺ CD3⁻ vivas.

Para investigar la potencia relativa de la combinación de receptores, se llevó a cabo la reticulación de NKG2D o CD16 y la co-reticulación de ambos receptores mediante estimulación unida a la placa. Tal como se muestra en la Figura 19 (Figuras 19A-19C), la estimulación combinada de CD16 y NKG2D resultó en niveles altamente elevados de CD 107a (degranulación) (Figura 19A) y/o producción de IFN-γ (Figura 19B). Las líneas punteadas representan un efecto aditivo de estimulaciones individuales de cada receptor.

Los niveles de CD107a y la producción de IFN-γ intracelular de células NK activadas por IL-2 fueron analizados luego de 4 horas de estimulación unida a la placa con anti-CD16, anti-NKG2D o una combinación de ambos anticuerpos monoclonales. Los gráficos indican la media ($n = 2$) ± SD. La Figura 19A demuestra niveles de CD107a; la Figura 19B demuestra niveles de IFN-γ; la Figura 19C demuestra niveles de CD107a e IFN-γ. Los datos que se muestran en la Figuras 19A-19C son representativos de cinco experimentos independientes mediante el uso de cinco donadores sanos diferentes.

Ejemplo 8- Evaluación de TriNKET que se unen a NKG2D humano expresado por células.

Las líneas celulares de linfoma de ratón EL4 se modificaron para expresar NKG2D humano. Las proteínas de unión multiespecífica, p.ej., proteínas de unión triespecífica (TriNKET), cada una conteniendo un dominio de unión a NKG2D, un dominio de unión a FLT3 y un dominio Fc que se une a CD16, se analizaron por su afinidad para unirse a NKG2D extracelular expresado en células

EL4. Los TriNKET se diluyeron a 20 µg/ml y luego se diluyeron en serie. La unión de los TriNKET a NKG2D se detectó mediante el uso de anticuerpos secundarios de IgG anti-humana conjugados con un fluoróforo. Luego se analizaron las células mediante citometría de flujo y la intensidad promedio de fluorescencia (MFI) se normalizó a controles de anticuerpo secundario para obtener valores de múltiplo de fondo (FOB).

Los TriNKET analizados fueron A44-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-27744; y un dominio de unión a FLT3 derivado del anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10, p. ej., al incorporar una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:109 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:113), A44-TriNKET-FLT3-4G8 (un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-27744; y un dominio de unión a FLT3 derivado del anticuerpo monoclonal de 4G8, p. ej., al incorporar una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 117 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:121), A49-TriNKET-FLT3-IMCEB10 (un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-27749; y un dominio de unión a FLT3 derivado del anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10, p. ej., al incorporar una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:109 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:113), A49-TriNKET-FLT3-4G8 (un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-27749; y un dominio de unión a FLT3 derivado del anticuerpo monoclonal de 4G8, p. ej., al incorporar una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:117 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:121), C26-TriNKET-FLT3-4G8 (un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-28226; y un dominio de unión a FLT3 derivado del anticuerpo monoclonal de 4G8, p. ej., al incorporar una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:117 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:121). Se utilizó el anticuerpo monoclonal de FLT3 IMCEB10 como control. Los TriNKET que contienen dominio de unión a NKG2D (A44, A49, o C26) mostraron la unión a NKG2D expresada en la superficie celular. Los TriNKET que contienen el mismo dominio de unión a NKG2D pero un dominio de unión a FLT3 diferente mostraron afinidad de unión similar a NKG2D en la superficie celular (Figura 35).

Ejemplo 9- Evaluación de la unión de los TriNKET a FLT3 expresado en las células cancerosas.

Las líneas celulares de AML humanas (Molm-13 y EOL-1) que expresan FLT3 se utilizaron para evaluar la unión de los TriNKET que se dirigen a FLT3 al antígeno asociado a tumores. Los TriNKET se incubaron con las células y se detectó la unión mediante el uso de anticuerpos secundarios de IgG anti-humana conjugados con un fluoróforo. Se analizaron las células mediante citometría de

flujo y la intensidad promedio de fluorescencia (MFI) se normalizó a controles de anticuerpo secundario para obtener valores de múltiplo de fondo (FOB).

Los TriNKET que se dirigen a FLT3 que contienen un dominio de unión a FLT3 de IMCEB10 o 4G8 mostraron unión positiva a células Molm-13 y EOL-1 (Figura 36A y Figura 36B). La unión de los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de IMCEB10 o 4G8 a líneas celulares de AML humanas fue independiente de los dominios de unión a NKG2D. Los TriNKET que contienen el dominio de unión a FLT3 de 4G8 mostraron una unión máxima y valores de EC₅₀ más altos.

Ejemplo 10- Internalización de los TriNKET que se dirigen a FLT3 en células que expresan FLT3.

Las líneas celulares de AML humanas Molm-13 y EOL-1 se utilizaron para evaluar la internalización de los TriNKET que se dirigen a FLT3 luego de la unión a FLT3 expresada en la superficie celular.

Los TriNKET o el anticuerpo monoclonal lintuzumab se diluyeron a 20 µg/ml y se utilizaron para teñir las células. Luego de la tinción, dos tercios de la muestra se colocaron a 37 °C durante la noche para facilitar la internalización, y el otro tercio de la muestra se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario de IgG anti-humana conjugado con un fluoróforo, proporcionando MFI de referencia. Luego de 2 horas y 20 horas de incubación a 37 °C, se extrajeron las muestras de la incubadora y el anticuerpo unido en la superficie de las células se detectó mediante el uso de un anticuerpo secundario de IgG anti-humana conjugado con un fluoróforo, proporcionando MFI de muestra. Se calculó la internalización: % internalización = $(1 - (\text{MFI de muestra} / \text{MFI de referencia})) \times 100 \%$.

Las Figuras 37A y 37B mostraron la internalización de los TriNKET que se dirigen a FLT3 luego de la incubación con células EOL-1 y Molm-13 respectivamente. El anticuerpo monoclonal anti-CD33 Lintuzumab se utilizó como un control positivo para la internalización, dado que CD33 se expresa en líneas celulares de Molm-13 y EOL-1. Lintuzumab mostró niveles altos de internalización en ambas líneas celulares y la internalización aumentó con el tiempo. Los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de IMCEB10 mostraron un nivel más alto de internalización luego de 2 horas de incubación en comparación con los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de 4G8. Luego de 20 horas de incubación, los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de 4G8 y los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de IMCEB10 mostraron niveles similares de internalización en las células.

Ejemplo 11- Los TriNKET aumentan la citotoxicidad de células NK humanas hacia las células cancerosas.

5

Para evaluar la capacidad que tienen las células NK para lisar células cancerosas que expresan FLT3 en presencia de TriNKET que se dirigen a FLT3, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron y prepararon para el aislamiento de las células NK. Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias de sangre periférica humana mediante el uso de centrifugación por gradiente de densidad. Las PBMC aisladas se lavaron y prepararon para el aislamiento de células NK. Las células NK se aislaron mediante selección negativa con perlas magnéticas y la pureza de las células NK aisladas fue normalmente >90 % de CD3-CD56+. Las células NK aisladas se cultivaron en medios que contienen 100 ng/ml de IL-2 o se dejaron reposar durante la noche sin citocina. Las células NK inactivadas o activadas por IL-2 se utilizaron al siguiente día en ensayos de citotoxicidad.

15

Todos los ensayos de citotoxicidad se prepararon de la siguiente forma: las células tumorales positivas para FLT3 EOL-1 se recolectaron del cultivo, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medios de crecimiento a 10^6 /ml para el etiquetado con el reactivo BATDA (Perkin Elmer C136-100). Se siguieron las instrucciones del fabricante para el etiquetado de las células diana. Luego del etiquetado, las células se lavaron 3 veces con HBS y se resuspendieron a $0.5-1.0 \times 10^5$ /ml en los medios de cultivo. Para preparar los pocillos del fondo, se dejó a un lado una alícuota de las células etiquetadas y las células se centrifugaron fuera del medio. Se agregaron cuidadosamente 100 μ L de los medios a los pocillos en triplicado para evitar alterar las células precipitadas. Se agregaron 100 μ L de células etiquetadas BATDA a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los pocillos fueron guardados para liberación espontánea desde células diana y los pocillos fueron preparados para lisis máxima de células diana mediante la adición de Triton-X al 1 %. Los anticuerpos monoclonales de FLT3 o los TriNKET que se dirigen a FLT3 se diluyeron en medios de cultivo y se agregaron 50 μ L de anticuerpos monoclonales diluidos o TriNKET a cada pocillo. Las células NK inactivadas y/o activadas se recolectaron del cultivo, se lavaron y se resuspendieron a $10^5-2.0 \times 10^6$ /ml en medios de cultivo dependiendo de la relación célula efectora deseada/célula diana. Se agregaron 50 μ L de células NK a cada pocillo de la placa para hacer un volumen de cultivo total de 200 μ L. La placa se incubó a 37 °C con 5 % CO₂ durante 2-3 horas antes de desarrollar el ensayo.

30

Luego de cultivar durante 2-3 horas, se removió la placa de la incubadora y las células precipitaron mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Se transfirieron 20 µL de sobrenadante de cultivo a una microplaca limpia proporcionada por el fabricante y se agregaron 200 µL de solución de europio a temperatura ambiente a cada pocillo. La placa fue protegida de la luz e incubada en un agitador de placa a 250 rpm durante 15 minutos. La placa se leyó utilizando instrumentos Victor 3 o SpectraMax i3X. El % de lisis específica se calculó de la siguiente manera: % lisis específica = ((Liberación experimental - Liberación espontánea) / (Liberación máxima - Liberación espontánea)) * 100 %.

Citotoxicidad mediada por los TriNKET que se dirigen a FLT3 de células NK humanas hacia células cancerosas EOL-1 positivas para FLT3. Tal como se muestra en la Figura 38A, TriNKET (A49-TriNKET-IMCEB10 y A44-TriNKET-IMCEB10) fueron capaces de aumentar la actividad citotóxica de células NK hacia las células cancerosas de una manera dependiente de la dosis. Ambos TriNKET fueron significativamente más potentes que el anticuerpo monoclonal de FLT3 correspondiente IMCEB10. Tal como se ilustra en la Figura 38B, TriNKET (A49-TriNKET-4G8, A44-TriNKET-4G8, y C26-TriNKET-4G8) fueron capaces de aumentar la actividad citotóxica de células NK hacia las células cancerosas de una manera dependiente de la dosis. Los TriNKET son significativamente más potentes que el anticuerpo monoclonal de FLT3 correspondiente 4G8. Además, los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de 4G8 fueron más potentes en mediar la citotoxicidad de células NK humanas que los TriNKET que contienen un dominio de unión a FLT3 de IMCEB10.

INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

La totalidad de la descripción de cada uno de los documentos de la patente y los artículos científicos mencionados en la presente se incorpora mediante esta referencia a todos los efectos.

EQUIVALENTES

La invención se puede emplear en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales de esta. Por lo tanto, se considerará que todas las modalidades anteriores son ilustrativas en todos los aspectos y no limitan la invención descrita en la presente. En consecuencia, el alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas y no por la descripción anterior, y se pretende que todos los cambios que entren dentro del significado y margen de equivalencia de las reivindicaciones sean abarcados por las mismas.