

PROTEÍNAS DE UNIÓN MULTIESPECÍFICAS Y MEJORAS CON ESTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 62/677 137, presentada el 28 de mayo de 2018, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia, a todos los efectos.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia ASCII, creada el 28 de mayo de 2019, se denomina DFY-049WO_SL_ST25.txt y tiene un tamaño de 340 101 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La invención proporciona mejoras en anticuerpos de fragmentos variables monocatenarios (scFv) y una proteína de unión multiespecífica, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas y métodos terapéuticos que utilizan dichas proteínas y composiciones farmacéuticas, incluido el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES

[0004] El cáncer sigue siendo un problema de salud importante a pesar de los considerables esfuerzos en investigación y avances científicos de los que se informa en la bibliografía para tratar esta enfermedad. Algunos de los cánceres diagnosticados con más frecuencia incluyen cáncer de próstata, cáncer de mama y carcinoma broncopulmonar. El cáncer de próstata es la forma más común de cáncer en los hombres. El cáncer de mama sigue siendo una de las principales causas de muerte en las mujeres. Las opciones de tratamiento actuales para estos cánceres no son eficaces para todos los pacientes y/o pueden tener efectos secundarios adversos sustanciales. También sigue siendo difícil tratar otros tipos de cánceres con las opciones terapéuticas existentes.

[0005] Las inmunoterapias contra el cáncer son deseables porque son muy específicas y pueden facilitar la destrucción de las células cancerosas utilizando el propio sistema inmunitario del paciente. Las proteínas de fusión, como los ligadores biespecíficos del linfocito T, son inmunoterapias contra el cáncer descritas en la bibliografía que se unen a las células tumorales y los linfocitos T para facilitar la destrucción de las células tumorales. En la bibliografía se han descrito anticuerpos que se unen a ciertos antígenos asociados a tumores y a ciertas células

inmunitarias. Véase, *por ejemplo*, WO 2016/134371 y WO 2015/095412.

[0006] Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son un componente del sistema inmunitario innato y constituyen aproximadamente el 15 % de los linfocitos circulantes. Los linfocitos NK se infiltran en casi todos los tejidos y originalmente se caracterizaron por su capacidad de destruir células tumorales de manera eficaz sin necesidad de sensibilización previa. Los linfocitos NK activados destruyen las células seleccionadas como diana por medios similares a los de los linfocitos T citotóxicos, *es decir*, a través de gránulos citolíticos que contienen perforina y grancimas, así como a través de las vías del receptor de muerte. Los linfocitos NK activados también secretan citocinas inflamatorias como IFN- γ y quimiocinas que promueven el reclutamiento de otros leucocitos en el tejido diana.

[0007] Los linfocitos NK responden a las señales a través de una diversidad de receptores activadores e inhibidores en su superficie. Por ejemplo, cuando los linfocitos NK se encuentran con células propias sanas, su actividad se inhibe mediante la activación de los receptores semejantes a la inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR, por su sigla en inglés). Alternativamente, cuando los linfocitos NK encuentran células extrañas o células cancerosas, se activan a través de sus receptores de activación (*por ejemplo*, NKG2D, NCR, DNAM1). Los linfocitos NK también se activan por la región constante de algunas inmunoglobulinas a través de los receptores CD16 en su superficie. La sensibilidad general de los linfocitos NK a la activación depende de la suma de señales estimulantes e inhibidoras. NKG2D es una proteína transmembranaria de tipo II que se expresa esencialmente en todos los linfocitos citolíticos naturales donde NKG2D sirve como receptor de activación. NKG2D también se encuentra en los linfocitos T donde actúa como un receptor coestimulador. La capacidad de modular la función de los linfocitos NK a través de NKG2D es útil en varios contextos terapéuticos, incluidas las neoplasias malignas.

COMPENDIO

[0008] En un aspecto, la presente invención proporciona una mejora en un fragmento variable monocatenario (scFv) que está unido a un dominio constante de anticuerpo mediante una secuencia de bisagra. En algunas modalidades, la bisagra comprende los aminoácidos Ala-Ser. En algunas otras modalidades, la bisagra comprende los aminoácidos Ala-Ser y Thr-Lys-Gly. El scFv puede incluir un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera. En algunas modalidades, el scFv se une a NKG2D o a un antígeno asociado a un tumor. La

secuencia de bisagra proporciona flexibilidad de unión al antígeno diana.

[0009] En algunas modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada forma un puente disulfuro con el dominio variable de la cadena ligera. Por ejemplo, se puede formar un puente disulfuro entre el residuo C44 del dominio variable de la cadena pesada y el residuo C100 del dominio variable de la cadena ligera. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada se une al dominio variable de la cadena ligera mediante un conector flexible, como (G₄S)₄ (SEQ ID NO:427). En algunas modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada se coloca en el extremo N del dominio variable de la cadena ligera. En algunas modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada se coloca en el extremo C del dominio variable de la cadena ligera.

[0010] En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo unido al scFv es capaz de unirse a CD16. En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo comprende un dominio CH₂ y un dominio CH₃ de un anticuerpo IgG, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 humana. En algunas modalidades, se introducen mutaciones en el dominio constante del anticuerpo para permitir la heterodimerización con otro dominio constante del anticuerpo. Por ejemplo, si el dominio constante del anticuerpo se deriva del dominio constante de una IgG1 humana, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439. En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, 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, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D y K439E.

[0011] En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína que

contiene el scFv unido a una región constante de anticuerpo descrita anteriormente. En algunas modalidades, la proteína incluye un primer sitio de unión al antígeno, que comprende el scFv unido a un dominio constante del anticuerpo; un segundo sitio de unión al antígeno que puede adoptar el formato de Fab o de scFv descrito en la presente; y un segundo dominio constante de anticuerpo unido al segundo sitio de unión al antígeno. En algunas modalidades, la proteína es multiespecífica, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a NKG2D, los segundos sitios de unión al antígeno se unen a un antígeno asociado a un tumor y las regiones constantes del anticuerpo se unen a CD16.

[0012] En algunas otras modalidades, la proteína es multiespecífica, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a un antígeno asociado al tumor, el segundo sitio de unión al antígeno se une a NKG2D y las regiones constantes del anticuerpo se unen a CD16. La región constante del anticuerpo unida al scFv puede heterodimerizarse con una segunda región constante del anticuerpo. Las proteínas de unión multiespecíficas en estas modalidades se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en los linfocitos citolíticos naturales, y a un antígeno asociado al tumor en las células cancerosas. Dichas proteínas pueden entrar en contacto con más de un tipo de receptor activador de NK y pueden bloquear la unión de los ligandos naturales para NKG2D. En ciertas modalidades, las proteínas pueden actuar como agonistas de los linfocitos NK en humanos. En algunas modalidades, las proteínas pueden actuar como agonistas de los linfocitos NK en humanos y/o en otras especies tales como roedores y/o macacos cangrejeros.

[0013] En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína de unión multiespecífica y la proteína contiene un primer sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado a un tumor; un segundo sitio de unión al antígeno que se une al mismo antígeno asociado al tumor que el primer sitio de unión al antígeno; un tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; y una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un cuarto sitio de unión al antígeno que se une a CD16. Cualquiera de los sitios de unión al antígeno puede adoptar la forma de un Fab o un scFv, como los descritos anteriormente. La proteína de unión multiespecífica proporcionada en la presente genera una interacción bivalente del antígeno asociado al tumor, con lo que se estabiliza el antígeno asociado al tumor en la superficie de la célula cancerosa y se potencia la citotoxicidad hacia las células cancerosas con los linfocitos NK.

[0014] En algunas modalidades, la interacción bivalente de antígenos asociados a tumores con las proteínas de unión multiespecíficas confiere una unión más potente de las proteínas de unión multiespecíficas a las células cancerosas, lo que facilita una respuesta citotóxica más potente de los linfocitos NK hacia las células cancerosas, especialmente hacia las células cancerosas que expresan un nivel bajo del antígeno asociado al tumor.

[0015] En algunas modalidades, las proteínas de unión multiespecíficas incorporan una parte de un dominio Fc del anticuerpo, que sea suficiente para unirse a CD16, en donde el dominio Fc del anticuerpo comprende una bisagra y un dominio CH2 y/o secuencias de aminoácidos al menos 90 % idénticas a la secuencia de aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG humana. Pueden introducirse mutaciones en el dominio constante del anticuerpo para permitir la heterodimerización con otro dominio constante del anticuerpo. Por ejemplo, si el dominio constante del anticuerpo se deriva del dominio constante de una IgG1 humana, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439.

[0016] En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, 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, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D y K439E.

[0017] El sitio de unión al antígeno que se asocia al tumor que se describió anteriormente puede ser un sitio que se une a cualquier antígeno asociado al tumor, por ejemplo, ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70,

CLAUDIN-18.2, DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, mesotelina, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-alfa, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, nectina 4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 y ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-cadherina, plexina A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (o MUC1-C), plexina A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 y TYRP1.

[0018] En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína que comprende: (a) un sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; (b) un fragmento del receptor de linfocitos T (TCR, por su sigla en inglés) de unión al antígeno; y (c) una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un sitio de unión al antígeno adicional que se una a CD16. En determinadas modalidades, la proteína es una proteína de unión multiespecífica que comprende un fragmento de TCR de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado al tumor (TAA, por su sigla en inglés).

[0019] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un fragmento Fab y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de TCR monocatenario (scTCR, por su sigla en inglés). En determinadas modalidades, el fragmento scTCR se une a una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, la bisagra comprende además la secuencia de aminoácidos Thr-Lys-Gly.

[0020] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un scFv y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de TCR extracelular. En determinadas modalidades, el scFv se une a una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, la bisagra comprende además la secuencia de aminoácidos Thr-Lys-Gly.

[0021] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un fragmento Fab y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de TCR extracelular.

[0022] En determinadas modalidades, la proteína de unión multiespecífica
5 comprende además un fragmento de TCR de unión al antígeno adicional que se une al mismo antígeno que el fragmento de TCR de unión al antígeno. En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un scFv, y el fragmento de TCR de unión al antígeno y el fragmento de TCR de unión al antígeno adicional son fragmentos de TCR extracelulares. En determinadas modalidades, el sitio de unión
10 al antígeno es un scFv, y el fragmento de TCR de unión al antígeno y el fragmento de TCR de unión al antígeno adicional son fragmentos de scTCR.

[0023] En determinadas modalidades de la proteína de unión multiespecífica que contiene un scFv, el scFv comprende un dominio variable de la cadena pesada unido a un dominio variable de la cadena ligera mediante un conector flexible. En
15 determinadas modalidades, el conector flexible comprende (G₄S)₄. En determinadas modalidades, el scFv comprende un dominio variable de la cadena pesada situado en el extremo N o en el extremo C de un dominio variable de la cadena ligera.

[0024] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, y en
20 donde el dominio variable de la cadena pesada forma un puente disulfuro con el dominio variable de la cadena ligera. En ciertas modalidades, el puente disulfuro se forma entre Cys en la posición 44 en el dominio variable de la cadena pesada y Cys en la posición 100 en el dominio variable de la cadena ligera, y las posiciones se definen según la numeración de Kabat. En determinadas modalidades, el sitio de
25 unión al antígeno que contiene tal puente disulfuro es un scFv.

[0025] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno se une a NKG2D en humanos.

[0026] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido de un antígeno asociado a un tumor, mediante la presentación
30 con un complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por su sigla en inglés).

[0027] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido ELAVL4 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:425 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la

cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:351 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:352. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:351 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:353) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:352 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:354) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:349 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:350.

[0028] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido de la insulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:426 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:357 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:358. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:357 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:359) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:358 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:360) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:355 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:356.

[0029] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido TERT que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:340 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la

5 cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:363 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:364. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:363 y/o incorpora una

10 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:365) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:364 y/o incorpora una

15 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:366) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:361 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:362.

20 **[0030]** En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido ERBB2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:341 presentada por HLA-A*02. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:430 y un dominio variable de la cadena beta

25 relacionado con la SEQ ID NO:431. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:430 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:367) del

30 dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:431 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:368) del

dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:428 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:429.

- 5 **[0031]** En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido WT1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:342 presentada por HLA-A*02. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:434 y un dominio variable de la cadena beta
- 10 relacionado con la SEQ ID NO:435. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:434 y/o incorporan una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:369) del
- 15 dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:435 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:370) del
- 20 dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:432 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:433.

- [0032]** En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno
- 25 se une a un péptido WT1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:342 presentada por HLA-A*02. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:438 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:439. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el
- 30 fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:438 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:371) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el

fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:439 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:372) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:436 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:437.

[0033] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido MAGE-A3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:343 presentada por HLA-A1. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:375 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:376. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:375 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:377) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:376 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:378) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:373 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:374.

[0034] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido MART1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:344 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:381 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:382. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la

cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:381 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:383) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:382 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:384) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:379 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:380.

[0035] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido BIRC5 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:346 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:442 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:443. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:442 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:389) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:443 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:390) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:440 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:441.

[0036] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido BIRC5 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:346 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de

TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:444 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:445. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la

5 cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:444 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:391) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la

10 cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:445 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:392) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena

15 alfa indicada en la SEQ ID NO:385 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:386.

[0037] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:347 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de

20 TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:395 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:396. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:395 y/o incorpora una

25 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:397) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:396 y/o incorpora una

30 secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:398) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:393 y una secuencia de aminoácidos de la cadena

beta indicada en la SEQ ID NO:394.

[0038] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:347 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:401 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:402. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:401 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:403) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:402 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:404) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:399 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:400.

[0039] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:347 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:407 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:408. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:407 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:409) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:408 y/o incorpora una

secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:410) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:405 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:406.

[0040] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido NY-ESO-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:348 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:413 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:414. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:413 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:415) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:414 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:416) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:411 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:412.

[0041] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido NY-ESO-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:348 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:418 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:414. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:418 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:415) del

dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:414 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:416) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:417 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:412.

[0042] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido NY-ESO-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:348 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa relacionado con la SEQ ID NO:421 y un dominio variable de la cadena beta relacionado con la SEQ ID NO:422. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:421 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 α (SEQ ID NO:423) del dominio variable de la cadena alfa. De manera similar, en ciertas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena beta al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:422 y/o incorpora una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia CDR3 β (SEQ ID NO:424) del dominio variable de la cadena beta. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena alfa indicada en la SEQ ID NO:419 y una secuencia de aminoácidos de la cadena beta indicada en la SEQ ID NO:420.

[0043] En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido SSX2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:345 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa que incorpora una secuencia CDR3 α indicada en la SEQ ID NO:387. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio

variable de la cadena beta que incorpora una secuencia CDR3 β indicada en la SEQ ID NO:388.

[0044] En ciertas modalidades, la proteína de unión multiespecífica comprende una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para

5 unirse a CD16, en donde la región constante del anticuerpo o la parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16 comprende una bisagra y el dominio CH2 de un anticuerpo de IgG1 humana. En determinadas modalidades, la región constante del anticuerpo o la parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16 comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332

10 de un anticuerpo de IgG1 humana. Pueden introducirse mutaciones en el dominio constante del anticuerpo para permitir la heterodimerización con otro dominio constante del anticuerpo. Por ejemplo, si el dominio constante del anticuerpo se deriva del dominio constante de una IgG1 humana, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en

15 un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439. En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica

20 al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, L351K, L351D, L351Y, S354C, E356K, E357Q, E357L, E357W, K360E, K360W, Q362E, S364K, S364E, S364H, S364D, T366V, T366I, T366L, T366M, T366K, T366W, T366S,

25 L368E, L368A, L368D, K370S, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, T394F, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D y K439E.

[0045] En determinadas modalidades de cualquiera de los polipéptidos o

30 proteínas anteriores que contienen un sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D (que se denomina también “sitio de unión a NKG2D”), el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada que se relaciona con la SEQ ID NO:1, por ejemplo porque tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %).

99 % o 100 %) idéntica a la SEQ ID NO:1, y/o puede incorporar secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:307), CDR2 (SEQ ID NO:4) y CDR3 (SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:308) de la SEQ ID NO:1. El dominio variable de la cadena pesada que se relaciona con la SEQ ID NO:1 se puede acoplar a una diversidad de dominios variables de la cadena ligera para formar un sitio de unión a NKG2D. Por ejemplo, el sitio de unión a NKG2D que incorpora un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:1 puede incorporar además un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de cualquiera de las secuencias relacionadas con las SEQ ID NO:2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43. Por ejemplo, el sitio de unión a NKG2D incorpora un dominio variable de la 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 la 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 seleccionadas de las SEQ ID NO:2, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43.

[0046] Alternativamente, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:44 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:48. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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: 44, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:309), CDR2 (SEQ ID NO:46) y CDR3 (SEQ ID NO:47 o SEQ ID NO:310) de la SEQ ID NO:44. De manera similar, el dominio variable de la 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:48, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:49), CDR2 (SEQ ID NO:50) y CDR3 (SEQ ID NO:51) de la SEQ ID NO:48.

[0047] En otras modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:52 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:56. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:52, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:53 o SEQ ID NO:311), CDR2 (SEQ ID NO:54)y CDR3 (SEQ ID NO:55 o SEQ ID NO:312) de la SEQ ID NO:52. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:56, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:57), CDR2 (SEQ ID NO:58)y CDR3 (SEQ ID NO:59) de la SEQ ID NO:56.

10 **[0048]** Alternativamente, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:60 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:61, tal como al tener 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:60 y al
15 menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO:61 respectivamente.

[0049] En otra modalidad, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:62 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:66. Por ejemplo, el
20 dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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 CDR1 (SEQ ID NO:63), CDR2 (SEQ ID NO:64)y CDR3 (SEQ ID NO: 65) de la SEQ ID NO:62. De manera similar, el dominio
25 variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:66, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:68)y CDR3 (SEQ ID NO:69) de la SEQ ID NO:66.

30 **[0050]** El sitio de unión a NKG2D, en algunas modalidades, puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:70 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:74. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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 CDR1 (SEQ ID NO:71), CDR2 (SEQ ID NO:72)y CDR3 (SEQ ID NO:73) de la SEQ ID NO:70.

99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:70, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:71 o SEQ ID NO:313), CDR2 (SEQ ID NO:72)y CDR3 (SEQ ID NO:73 o SEQ ID NO:314) de la SEQ ID NO:70. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:74, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:75), CDR2 (SEQ ID NO:76)y CDR3 (SEQ ID NO:77) de la SEQ ID NO:74.

[0051] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:78 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:82. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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 CDR1 (SEQ ID NO:79 o SEQ ID NO:315), CDR2 (SEQ ID NO:80)y CDR3 (SEQ ID NO:81 o SEQ ID NO:316) de la SEQ ID NO:78. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:82, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:83), CDR2 (SEQ ID NO:84)y CDR3 (SEQ ID NO:85) de la SEQ ID NO:82.

[0052] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:86 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:90. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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 CDR1 (SEQ ID NO:87 o SEQ ID NO:317), CDR2 (SEQ ID NO:88)y CDR3 (SEQ ID NO:89 o SEQ ID NO:318) de la SEQ ID NO:86. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión de NKG2D puede ser al menos del 90% (*por ejemplo*, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% , o 100%) idéntico a la SEQ ID NO: 90, y / o incorporan secuencias de aminoácidos idénticas a CDR1 (SEQ ID NO: 91), CDR2 (SEQ ID NO: 92)y CDR3 (SEQ ID NO: 93) secuencias de SEQ ID NO: 90.

[0053] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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 CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:97 o SEQ ID NO:320) de la SEQ ID NO:94. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0054] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:102 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:106. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:102, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:103 o SEQ ID NO:313), CDR2 (SEQ ID NO:104)y CDR3 (SEQ ID NO:105 o SEQ ID NO:321) de la SEQ ID NO:102. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:106, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:107), CDR2 (SEQ ID NO:108)y CDR3 (SEQ ID NO:109) de la SEQ ID NO:106.

[0055] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:322 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:322, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:323 o SEQ ID NO:324) de la SEQ ID

NO:322. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99),
 5 CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0056] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:325 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D puede ser al
 10 menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idéntico a la SEQ ID NO:325, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:326 o SEQ ID NO:327) de la SEQ ID NO:325. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión
 15 a NKG2D 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:98, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0057] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un
 20 dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:328 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:328, y/o incorpora secuencias de
 25 aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:329 o SEQ ID NO:330) de la SEQ ID NO:328. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora
 30 secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0058] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:331 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo,

el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:331, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:332 o SEQ ID NO:333) de la SEQ ID NO:331. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0059] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:334 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:334, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:335 o SEQ ID NO:336) de la SEQ ID NO:334. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100)y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0060] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:337 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:98. Por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del sitio de unión a NKG2D 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:337, y/o incorpora secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:95 o SEQ ID NO:319), CDR2 (SEQ ID NO:96)y CDR3 (SEQ ID NO:338 o SEQ ID NO:339) de la SEQ ID NO:337. De manera similar, el dominio variable de la cadena ligera del sitio de unión a NKG2D 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:98, y/o incorpora

secuencias de aminoácidos idénticas a las secuencias CDR1 (SEQ ID NO:99), CDR2 (SEQ ID NO:100) y CDR3 (SEQ ID NO:101) de la SEQ ID NO:98.

[0061] En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:110 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:111, tal como al tener 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:110 y al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO:111 respectivamente. En algunas modalidades, el sitio de unión a NKG2D puede incorporar un dominio variable de la cadena pesada relacionado con la SEQ ID NO:112 y un dominio variable de la cadena ligera relacionado con la SEQ ID NO:113, tal como al tener 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:112 y al menos 90 % (*por ejemplo*, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) idénticas a la SEQ ID NO:113 respectivamente.

[0062] También se proporcionan formulaciones que contienen cualquiera de las proteínas descritas en la presente; células que contienen uno o más ácidos nucleicos que expresan las proteínas y métodos para potenciar la muerte de las células tumorales usando las proteínas.

[0063] Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente. El método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las proteínas de unión multiespecíficas descritas en la presente. Los cánceres a tratar pueden incluir leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica aguda, linfoma de linfocitos B, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, linfoma difuso de linfocitos B grandes, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, linfoma folicular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal, glioblastoma, cáncer de las vías respiratorias y digestivas altas, melanoma, mesotelioma, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, carcinoma de células renales, neuroblastoma, carcinomas broncopulmonares no microcíticos, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario y cáncer de páncreas, cáncer de próstata, sarcomas, carcinoma microcítico de pulmón, linfoma de linfocitos T, cáncer de testículo, carcinoma de timo, cáncer de tiroides, cáncer urotelial, cánceres infiltrados por células mieloides supresoras,

cánceres infiltrados por linfocitos T reguladores, cánceres con depósito de matriz extracelular, cánceres con un alto nivel de estroma reactivo y cánceres con neoangiogénesis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 **[0064]** En las **FIG. 1A-1C** se ilustran tres formatos de ejemplo de una proteína de unión multiespecífica que incluye el scFv unido a una región/dominio constante del anticuerpo a través de una bisagra. En la **FIG. 1A** se representa un anticuerpo triespecífico (TriNKET) que contiene un fragmento scFv o TCR monocatenario (scTCR) dirigido al tumor, un Fab dirigido a NKG2D y una región/dominio constante del anticuerpo heterodimerizado ("dominio CD") que se une a CD16. El formato del anticuerpo se denomina en la presente F3'-TriNKET. En la **FIG. 1B** se representa un anticuerpo que contiene un scFv dirigido a NKG2D, un Fab dirigido al tumor o un fragmento de TCR extracelular y una región constante de anticuerpo heterodimerizado. El formato del anticuerpo se denomina aquí F3-TriNKET. En la
- 10 **FIG. 1C** se representa un anticuerpo que contiene un scFv dirigido a NKG2D, un fragmento scFv o scTCR dirigido al tumor y una región constante de anticuerpo heterodimerizado. En ciertos TriNKET de ejemplo, las mutaciones de heterodimerización en el dominio CD unido al sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D incluyen K360E y K409W; las mutaciones de heterodimerización en el CD opuesto incluyen Q347R, D399V y F405T.
- 15 **[0065]** En la **FIG. 2A** se ilustra un anticuerpo triespecífico (TriNKET), en donde el primer sitio de unión al antígeno o el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un antígeno asociado al tumor (como el BCMA que se muestra en la presente) o un péptido de este presentado por un complejo principal de histocompatibilidad (MHC); el segundo sitio de unión al antígeno se une a NKG2D; y una región constante de anticuerpo heterodimerizado se une a CD16. En ciertos TriNKET de ejemplo, las mutaciones de heterodimerización en el dominio CD unido al sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D incluyen K360E y K409W; las mutaciones de heterodimerización en el CD opuesto incluyen Q347R, D399V y F405T.
- 25 **[0066]** En las **FIG. 2B-2C** se ilustran un anticuerpo triespecífico (TriNKET), en donde el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno, o el primer fragmento de TCR de unión al antígeno y el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno, se unen al mismo antígeno asociado al tumor (como BCMA que se muestra en la presente) o el mismo péptido de un antígeno asociado al tumor
- 30

presentado por el mismo MHC; el tercer sitio de unión al antígeno se une a NKG2D; y una región constante de anticuerpo heterodimerizado se une a CD16. Estos formatos de anticuerpos se denominan aquí F4-TriNKET. En ciertos TriNKET de ejemplo, las mutaciones de heterodimerización en el dominio CD unido al sitio de

5 unión al antígeno que se une a NKG2D incluyen K360E y K409W; las mutaciones de heterodimerización en el CD opuesto incluyen Q347R, D399V y F405T. **En la FIG. 2B** se ilustran los dos primeros sitios de unión al antígeno en el formato Fab. En la **FIG. 2C** se ilustran los dos primeros sitios de unión al antígeno en el formato scFv.

[0067] **En las FIG. 3A-3C** se muestran los resultados de un estudio de estabilidad acelerado llevado a cabo a 37 °C, en el que se halló que F3'-TriNKET fue estable

10 durante 4 semanas.

[0068] **En la FIG. 4** se muestra que el F3'-TriNKET purificado fue estable durante el mantenimiento de pH bajo.

[0069] **En la FIG. 5A y la FIG. 5B** se muestra que el F3'-TriNKET purificado fue

15 estable después de 5 ciclos de congelación y descongelación, independientemente del pH (en la FIG. 5A se muestran los ciclos de congelación y descongelación en PBS y en la FIG. 5B se muestran los ciclos de congelación y descongelación en citrato a pH 5,5).

[0070] **En la FIG. 6** se muestran gráficos de barras de las condiciones de degradación forzada en las que F3'-TriNKET permaneció estable.

20

[0071] **En la FIG. 7** se muestra la unión de F3'-TriNKET-HER2 o trastuzumab a células Colo-201 HER2+.

[0072] **En la FIG. 8** se muestra la unión de F3'-TriNKET-CD33 o el anticuerpo monoclonal CD33 a CD33 expresado en células Molm-13.

[0073] **En la FIG. 9 y la FIG. 10** se muestra la citotoxicidad mediada por F3'-TriNKET-HER2 en función de la estirpe celular 786-O con poca expresión de HER2 y la estirpe celular SkBr-3 con expresión elevada de HER2, respectivamente.

25

[0074] **En la FIG. 11 y la FIG. 12** se muestra la citotoxicidad mediada por F3'-TriNKET-CD33 hacia dos estirpes celulares humanas que expresan CD33, EOL-1 y

30 THP-1, respectivamente.

[0075] **En la FIG. 13A** se muestra que la unión de F3'-TriNKET-HER2 a FcγRIa es similar al Herceptin.

[0076] **En la FIG. 13B** se muestra que la unión de F3'-TriNKET-HER2 a FcγRIIa es similar a Herceptin. En la **FIG. 13C** se muestra que la unión de F3'-TriNKET-

HER2 a FcγRIIIa 158V es similar a Herceptin.

[0077] En la **FIG. 14A** se muestra que F3'-TriNKET-HER2, donde la proteína de unión de HER2 es un scFv, la unión a HER2 humano es similar a la del Herceptin en la que las proteínas de unión de HER2 son Fab. En la **FIG. 14B** se muestra que

5 F3'TriNKET-CD33, donde la proteína de unión de CD33 es un scFv, la unión a CD33 humano es similar a la del anticuerpo monoclonal CD33 en el que las proteínas de unión de CD33 son Fab.

[0078] En la **FIG. 15** se muestra que la purificación en dos etapas de F3-TriNKET-BCMA alcanza un 99 % de pureza.

10 [0079] En la **FIG. 16** se muestra la interacción simultánea de las dianas NKG2D y CD33 con potencia elevada por F3-TriNKET-CD33.

[0080] En la **FIG. 17** se muestra la interacción simultánea de las dianas NKG2D y BCMA con potencia elevada por F3-TriNKET-BCMA.

[0081] En la **FIG. 18A** se muestra que el formato F3-TriNKET es estable durante

15 al menos 14 días. En la **FIG. 18B** se muestra que el formato F3-TriNKET es estable después de mantener un pH bajo. En la **FIG. 18C** se muestra que el formato F3-TriNKET es estable después de al menos un máximo de 5 ciclos de congelación y descongelación.

[0082] La **FIG. 19** son gráficos de líneas en los que se muestra que los F4-TriNKET que se dirigen a BCMA con diferentes dominios de unión a NKG2D

20 potencian la lisis con linfocitos NK humanos de células de mieloma KMS12-PE.

[0083] La **FIG. 20** son gráficos de líneas en los que se muestra que los F4-TriNKET que se dirigen a BCMA con diferentes dominios de unión a NKG2D potencian la lisis con linfocitos NK humanos de células de mieloma MM.1R.

25 [0084] La **FIG. 21** son gráficos de líneas en los que se muestra la unión de F4-TriNKET, DuoBody-TriNKET y el anticuerpo monoclonal contra BCMA a las células de mieloma MM.1R.

[0085] La **FIG. 22** son FACS en las que se muestra que la incubación con F4-TriNKET aumenta la expresión de BCMA de superficie con el tiempo.

30 [0086] La **FIG. 23** son gráficos de líneas en los que se muestra que F4-TriNKET estabiliza BCMA de superficie.

[0087] La **FIG. 24** son gráficos de barras en los que se muestra que F4-TriNKET dirigido a BCMA con la proteína de unión A49 media una destrucción más potente de las células de mieloma KMS12-PE a diferentes concentraciones durante 30 horas

que el DuoBody-TriNKET.

[0088] La FIG. 25 son gráficos de barras que muestran que el F4-TriNKET dirigido a BCMA con la proteína de unión A49 media una destrucción más potente de las células de mieloma MM.1S a diferentes concentraciones durante 30 horas que el DuoBody-TriNKET.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0089] La invención proporciona una mejora en un fragmento variable monocatenario (scFv) que está unido a un dominio constante del anticuerpo mediante una secuencia de bisagra. La secuencia de bisagra proporciona flexibilidad a la unión de scFv a un antígeno. Esta invención también proporciona proteínas de unión multiespecíficas que incluyen uno o más de los scFv, en donde las proteínas de unión multiespecíficas se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en linfocitos citolíticos naturales y un antígeno asociado al tumor. En esta invención también se proporcionan proteínas de unión multiespecíficas que contienen dos sitios de unión al antígeno asociados al tumor que se unen al mismo antígeno asociado al tumor y que se unen al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en linfocitos citolíticos naturales. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas de unión multiespecíficas y métodos terapéuticos que utilizan tales proteínas de unión multiespecíficas y composiciones farmacéuticas, con fines tales como tratar el cáncer. Varios aspectos de la invención se exponen a continuación en otras secciones; sin embargo, los aspectos de la invención descritos en una sección en particular no deben limitarse a ninguna sección en particular.

[0090] Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen varios términos y frases.

[0091] Los términos "un" y "una", como se usan en la presente, significan "uno o más" e incluyen el plural a menos que el contexto no resulte adecuado.

[0092] Como se usa en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un organismo que va a recibir tratamiento con los métodos y composiciones descritos en la presente. Dichos organismos incluyen preferentemente, de modo no taxativo, mamíferos (*por ejemplo*, murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares) y más preferentemente incluyen humanos.

[0093] Como se usa en 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 los anticuerpos humanos, el sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") de extremo N de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos muy diferentes dentro de las

5 regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones hipervariables", las que se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones de armazón" o "FR". Por tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre las regiones hipervariables en inmunoglobulinas y junto a estas. En una molécula de anticuerpo humano, las tres

10 regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional que forma una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan

15 "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR", por su sigla en inglés. En ciertos animales, como los camellos y los peces cartilaginosos, el sitio de unión al antígeno está formado por una única cadena de anticuerpos que proporciona 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

20 conserva la superficie de unión al antígeno, o en un polipéptido recombinante como un scFv, con un conector peptídico que conecta el dominio variable de la cadena pesada con el dominio variable de la cadena ligera en un único polipéptido.

[0094] Como se usa en la presente, los términos "fragmento del receptor de linfocitos T de unión al antígeno" y "fragmento de TCR de unión al antígeno" se usan

25 indistintamente y se refieren a una parte de un receptor de linfocitos T (TCR) que se une a un antígeno análogo. En los TCR $\alpha\beta$ humanos, un fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena alfa ($V\alpha$) y un dominio variable de la cadena beta ($V\beta$), cada uno de los cuales comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los bucles hipervariables

30 denominados CDR3 α y CDR3 β ocupan una posición central en la unión a un péptido del antígeno; los bucles CDR1 α , CDR2 α , CDR1 β y CDR2 β codificados por la estirpe germinal tienen mayor contacto con un MHC que presenta el péptido del antígeno. En los TCR $\gamma\delta$ humanos, un fragmento de TCR de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena gamma ($V\gamma$) y un dominio variable de la cadena delta

(V δ), cada uno de los cuales comprende tres CDR. Los TCR $\gamma\delta$ humanos reconocen antígenos (*por ejemplo*, péptidos o lípidos) presentados por el MHC o moléculas relacionadas al MHC (*por ejemplo*, CD1, el receptor de la proteína C endotelial (EPCR, por su sigla en inglés) o la secuencia A relacionada con el polipéptido del MHC de clase I (MICA, por su sigla en inglés)). Se entiende que otras proteínas, como F1-ATPasa, también pueden presentar antígenos a los TCR $\gamma\delta$. Los fragmentos de TCR que se unen al antígeno pueden existir en un TCR intacto, en un TCR modificado que tiene cadenas de TCR unidas por un enlace disulfuro, en un fragmento de unión al antígeno de un TCR intacto o modificado que conserva la superficie de unión al antígeno, o en un polipéptido recombinante que tiene dominios variables de un TCR (*por ejemplo*, V α y V β) conectados por un péptido conector en un único polipéptido. Los ejemplos no taxativos de un fragmento de TCR de unión al antígeno incluyen un fragmento de TCR que comprende los dominios variables (*por ejemplo*, V α y V β) y los dominios constantes (*por ejemplo*, C α y C β) pero que carecen de las regiones de conexión, regiones transmembranarias y regiones citoplásmicas de la TCR, denominado en la presente "fragmento de TCR extracelular", y las regiones variables de un TCR (*por ejemplo*, V α y V β) conectadas por un conector peptídico, denominado en la presente "fragmento de TCR monocatenario (scTCR)".

[0095] Como se usa en la presente, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto (*por ejemplo*, un compuesto de la presente invención) suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o tomas y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración en particular.

Como se usa en la presente, el término "tratar" incluye cualquier efecto, *por ejemplo*, disminuir, reducir, regular, mejorar o eliminar, que produzca la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o que mejore un síntoma de estos.

[0096] Como se usa en la presente, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un principio activo con un excipiente, inerte o activo, lo que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*.

[0097] Como se usa en la presente, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los excipientes farmacéuticos habituales, como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones (*por ejemplo*, tal

como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite) y varios tipos de humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para obtener ejemplos de excipientes, estabilizadores y adyuvantes, véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^o edición, Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[0098] A lo largo de la descripción, cuando se describe que las composiciones tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, o cuando se describen procesos y métodos que tienen, que incluyen o que comprenden etapas específicas, se contempla que, además, hay composiciones de la presente invención que consisten esencialmente o consisten en los componentes enumerados, y que existen procesos y métodos de acuerdo con la presente invención que consisten esencialmente o consisten en las etapas de procesamiento mencionadas.

[0099] Como cuestión general, las composiciones que especifican un porcentaje son en peso a menos que se especifique algo diferente. Además, si una variable no está acompañada de una definición, entonces prevalecerá la definición anterior de la variable.

I. PROTEÍNAS

[0100] En la presente invención se proporciona una mejora en un fragmento variable monocatenario (scFv) que está unido a un dominio constante del anticuerpo mediante una secuencia de bisagra. En algunas modalidades, la bisagra comprende los aminoácidos Ala-Ser. En algunas otras modalidades, la bisagra comprende los aminoácidos Ala-Ser y Thr-Lys-Gly. El scFv puede incluir un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera. En algunas modalidades, el scFv se une a NKG2D o a un antígeno asociado a un tumor. La secuencia de bisagra proporciona flexibilidad en la unión del scFv al antígeno diana.

[0101] En algunas modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada forma un puente disulfuro con el dominio variable de la cadena ligera para mejorar la estabilidad del scFv. Por ejemplo, se puede formar un puente disulfuro entre el residuo C44 del dominio variable de la cadena pesada y el residuo C100 del dominio variable de la cadena ligera. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada se une al dominio variable de la cadena ligera mediante un conector flexible. Puede usarse cualquier conector adecuado, por ejemplo, el conector (G₄S)₄. En algunas modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada se coloca en el extremo N del dominio variable de la cadena ligera. En algunas

modalidades del scFv, el dominio variable de la cadena pesada se coloca en el extremo C del dominio variable de la cadena ligera.

[0102] En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo unido al scFv puede derivar de una región constante de un anticuerpo de cualquier especie que se una a CD16. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región constante es al menos 90 % idéntica a una región constante del anticuerpo humano, tal como una región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 o una 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 del anticuerpo de otro mamífero, tal como conejo, perro, gato, ratón o caballo. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo incluye una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH1. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo que incluye una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH1 se deriva de un anticuerpo de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana.

[0103] Dentro del dominio Fc, la unión a CD16 está mediada por la región de bisagra y el dominio CH2. Por ejemplo, dentro de la IgG1 humana, la interacción con CD16 se centra principalmente en los 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, Sonderrmann *et ál.*, Nature, 406 (6793):267-273). Según los dominios conocidos, las mutaciones se pueden seleccionar para mejorar o reducir la afinidad de unión a CD16, como mediante el uso de bibliotecas de expresión en fagos o bibliotecas de ADNc de expresión en la superficie de levaduras, o se pueden diseñar basándose en la estructura tridimensional conocida de la interacción.

[0104] En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de un anticuerpo de IgG, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 humana. En algunas modalidades, se introducen mutaciones en el dominio constante del anticuerpo para permitir la heterodimerización con otro dominio constante del anticuerpo. Por ejemplo, si el dominio constante del anticuerpo se deriva del dominio constante de una IgG1 humana, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica

al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439. En algunas modalidades, el dominio constante del anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana, y difiere en una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347E, Q347R, Y349S, Y349K, Y349T, Y349D, Y349E, Y349C, 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, D399R, D399K, D399V, S400K, S400R, D401K, F405A, F405T, Y407A, Y407I, Y407V, K409F, K409W, K409D, T411D, T411E, K439D y K439E.

[0105] A continuación se enumeran ejemplos del scFv ligado a una región constante del anticuerpo que también incluye mutaciones que permiten la heterodimerización de dos cadenas de polipéptidos. El scFv que contiene un dominio variable de la cadena pesada (V_H) y un dominio variable de la cadena ligera (V_L) de Trastuzumab se usa como ejemplo. Cada secuencia representa V_L -(G4S)₄- V_H -bisagra (AS)-Fc que contiene mutaciones de heterodimerización (subrayado). V_L y V_H contienen el puente S-S 44 V_H -100 V_L (subrayado) y pueden ser de cualquier anticuerpo de unión a NKG2D o dirigido a un tumor. El Ala-Ser (AS, subrayado) se incluye en la secuencia de la región de la bisagra del recodo para equilibrar la flexibilidad y la geometría óptima. En ciertas modalidades, se puede añadir una secuencia adicional Thr-Lys-Gly a la secuencia AS en la bisagra. El conector (G4S)₄ está subrayado en las secuencias enumeradas en el párrafo a continuación.

[0106] Trastuzumab –scFv-Fc A1 y Trastuzumab –scFv-Fc B1 pueden emparejarse preferentemente y formar un heterodímero. Trastuzumab –scFv-Fc A2 y Trastuzumab –scFv-Fc B2 pueden emparejarse preferentemente y formar un heterodímero.

Trastuzumab –scFv-Fc A1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSS

AS

5 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG (SEQ ID NO:303)

10 Trastuzumab –scFv-Fc B1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNG
15 YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
20 IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG (SEQ ID NO:304)

Trastuzumab –scFv-Fc A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
25 GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

GGGGSGGGSGGGSGGGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLLTVSS

30 **AS**

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL

SPG (SEQ ID NO:305)

Trastuzumab –scFv-Fc B2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGCGTKVEIK

5 **GGGGSGGGSGGGSGGGGS**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKCLEWVARIYPTNG
YTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW
GQGTLVTVSS

AS

10 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPG (SEQ ID NO:306)

15

[0107] En otro aspecto, en la presente invención se proporciona una proteína que contiene el scFv unido a una región constante del anticuerpo que se describió anteriormente. En algunas modalidades, la proteína incluye un primer sitio de unión al antígeno, que comprende el scFv unido a un dominio constante del anticuerpo; un
20 segundo sitio de unión al antígeno que puede tener el formato de Fab o de scFv; y un segundo dominio constante del anticuerpo unido al segundo sitio de unión al antígeno. En algunas modalidades, la proteína es multiespecífica, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a NKG2D, los segundos sitios de unión al antígeno, en forma de un Fab, se unen a un antígeno asociado al tumor y las
25 regiones constantes del anticuerpo se unen a CD16 (que se denomina en la presente F3-TriNKET, como se muestra en la FIG. 1B). En algunas otras modalidades, la proteína es multiespecífica, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a un antígeno asociado al tumor, el segundo sitio de unión al antígeno, en forma de un Fab, se une a NKG2D y las regiones constantes del
30 anticuerpo se unen a CD16 (que se denomina en la presente F3'-TriNKET, como se muestra en la FIG. 1A). La región constante del anticuerpo unida al scFv se heterodimeriza con la región constante del anticuerpo del segundo sitio de unión al antígeno de las proteínas descritas en la presente. Las proteínas de unión multiespecíficas que incluyen el scFv descrito en la presente pueden adoptar varios

formatos como se muestra en las FIG. 1A-1C.

[0108] Las proteínas de unión multiespecíficas pueden unirse a las células que expresan el receptor de NKG2D, que pueden incluir, de modo no taxativo, linfocitos NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺. Tras la unión a NKG2D, las proteínas de unión multiespecíficas pueden bloquear ligandos naturales, como ULBP6 y MICA, para que no se unan a NKG2D y activen los receptores de NKG2D.

[0109] Las proteínas de unión multiespecíficas se unen a células que expresan CD16, un receptor de Fc en la superficie de los leucocitos, incluidos los linfocitos citolíticos naturales, los macrófagos, los neutrófilos, los eosinófilos, los mastocitos y las células dendríticas foliculares.

[0110] Al unirse al receptor de NKG2D y al receptor de CD16 en los linfocitos citolíticos naturales, y a un antígeno asociado a un tumor en las células cancerosas, las proteínas de unión multiespecíficas pueden interactuar con más de un tipo de receptor activador de NK y pueden bloquear la unión de los ligandos naturales a NKG2D. En ciertas modalidades, las proteínas pueden actuar como agonistas de los linfocitos NK en humanos. En algunas modalidades, las proteínas pueden actuar como agonistas de los linfocitos NK en seres humanos y en otras especies tales como roedores y macacos cangrejeros.

[0111] En determinadas modalidades de la presente invención, una proteína de unión multiespecífica comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado a un tumor; un segundo sitio de unión al antígeno que se une al mismo antígeno asociado al tumor que el primer sitio de unión al antígeno; un tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; y una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un cuarto sitio de unión al antígeno que se une a CD16. Cualquiera de los sitios de unión al antígeno puede adoptar la forma de Fab o scFv. Los formatos de ejemplo se ilustran en la FIG. 2B-2C. Tanto la orientación de V_H-V_L como la de V_L-V_H de los scFv son modalidades de la presente descripción.

[0112] En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno o el segundo sitio de unión al antígeno que se unen al mismo antígeno asociado al tumor es un scFv, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno que se unen al mismo antígeno asociado al tumor son cada uno un scFv, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En

determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno o el segundo sitio de unión al antígeno que se unen al mismo antígeno asociado al tumor es un Fab, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno que se unen al mismo antígeno asociado al tumor son cada uno un Fab, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno de un F4-TriNKET de la presente descripción tienen secuencias de aminoácidos idénticas.

[0113] En otras modalidades, una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado al tumor; un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno diferente; un tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; y una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un cuarto sitio de unión al antígeno que se une a CD16. Cualquiera de los sitios de unión al antígeno puede adoptar la forma de Fab o scFv (en la orientación VH-VL o la VL-VH). En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno o el segundo sitio de unión al antígeno que se unen a dos antígenos diferentes son un scFv, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno que se unen a dos antígenos diferentes son cada uno un scFv, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno o el segundo sitio de unión al antígeno que se unen a dos antígenos diferentes son un Fab, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv. En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno y el segundo sitio de unión al antígeno que se unen a dos antígenos diferentes son cada uno un Fab, y el tercer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D es un scFv.

[0114] En ciertas modalidades, la proteína de unión multiespecífica (denominada en la presente F4-TriNKET) que se proporciona en la presente proporciona una interacción bivalente del antígeno asociado al tumor, lo que estabiliza y mantiene el antígeno asociado al tumor en la superficie de la célula cancerosa y mejora la citotoxicidad de los linfocitos NK contra las células cancerosas. En algunas modalidades, la interacción bivalente de los antígenos asociados al tumor por parte

de las proteínas de unión multiespecíficas confiere una mayor avidéz de las proteínas de unión multiespecíficas a las células cancerosas, lo que facilita una respuesta citotóxica más potente de los linfocitos NK hacia las células cancerosas, especialmente hacia las células cancerosas que expresen un nivel bajo del antígeno asociado al tumor.

[0115] En la presente invención se proporciona también una proteína de unión multiespecífica que comprende (a) un sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; (b) un fragmento de TCR de unión al antígeno; y (c) una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un sitio de unión al antígeno adicional que se una a CD16. En determinadas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno se une a un péptido de un antígeno asociado al tumor (TAA) presentado por un MHC, *por ejemplo*, un péptido de un antígeno asociado al tumor humano presentado por un antígeno leucocitario humano (HLA, por su sigla en inglés). El elemento (b) puede existir en varios formatos (*por ejemplo*, formatos solubles), como un fragmento de TCR extracelular o un fragmento de scTCR. Los elementos (a) y (c) pueden existir en varios formatos y/o comprender varias mutaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el elemento (c) es una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, comprendiendo la región constante del anticuerpo o parte de esta (i) un primer dominio constante del anticuerpo unido al sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, y (ii) un segundo dominio constante del anticuerpo unido al fragmento de TCR de unión al antígeno, en donde el primer y el segundo dominio constante del anticuerpo se pueden heterodimerizar.

[0116] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un fragmento Fab y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento scTCR. Dado que su parte de unión a NKG2D es un Fab y su parte de unión al TAA comprende los dominios variables unidos por un conector peptídico en una sola cadena (similar a la proteína de unión multiespecífica que comprende un primer sitio de unión al antígeno, que comprende un scFv unido a un dominio constante del anticuerpo; un segundo sitio de unión al antígeno, que adopta la forma de Fab; y un segundo dominio constante del anticuerpo que se une al segundo sitio de unión al antígeno, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a un antígeno asociado al tumor, el segundo sitio de unión al antígeno se une a NKG2D, y las regiones constantes del anticuerpo se unen a CD16), el formato de esta proteína de

unión multiespecífica también se denomina en la presente F3'-TriNKET, como se ilustra en la FIG. 1A.

[0117] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un scFv y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de TCR extracelular. Dado que su parte de unión a NKG2D es un scFv y su parte de unión al TAA comprende dominios variables y dominios constantes (similar a la proteína de unión multiespecífica que comprende un primer sitio de unión al antígeno, que comprende un scFv unido a un dominio constante del anticuerpo; un segundo sitio de unión al antígeno, que adopta la forma de Fab; y un segundo dominio constante del anticuerpo unido al segundo sitio de unión al antígeno, en donde el primer sitio de unión al antígeno se une a NKG2D, el segundo sitio de unión al antígeno se une a un antígeno asociado al tumor, y las regiones constantes del anticuerpo se unen a CD16), el formato de esta proteína de unión multiespecífica también se denomina en la presente F3-TriNKET, como se ilustra en la FIG. 1B.

[0118] En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un scFv, y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de scTCR. Tal formato se ilustra en la FIG. 1C. En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno es un Fab y el fragmento de TCR de unión al antígeno es un fragmento de TCR extracelular. Tal formato se ilustra en la FIG. 2A.

[0119] En determinadas modalidades, la proteína de unión multiespecífica comprende un primer fragmento de TCR de unión al antígeno que se une a un antígeno (*por ejemplo*, un péptido del TAA presentado por un MHC); un segundo fragmento de TCR de unión al antígeno que se une al mismo antígeno que el primer fragmento de TCR de unión al antígeno; un sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D; y una región constante del anticuerpo o una parte de esta que sea suficiente para unirse a CD16, o un cuarto sitio de unión al antígeno que se une a CD16. Alternativamente, se contempla que el primer fragmento de TCR de unión al antígeno y el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno pueden unirse a dos péptidos de TAA diferentes presentados por el mismo MHC o por diferentes. Cualquiera de los sitios de unión al antígeno puede adoptar la forma de Fab o scFv. El primer y segundo fragmento de TCR de unión al antígeno pueden adoptar la forma de un fragmento de TCR extracelular o un fragmento de scTCR. Los formatos de ejemplo, que proporcionan una interacción bivalente de un antígeno (*por ejemplo*, un péptido de TAA presentado por un MHC), se denominan en la presente F4-

TriNKET y se ilustran en las FIG. 2B-2C.

[0120] En determinadas modalidades, el primer fragmento de TCR de unión al antígeno y el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno de un F4-TriNKET de la presente descripción se unen al mismo péptido de TAA presentado por el mismo MHC. En determinadas modalidades, el primer fragmento de TCR de unión al antígeno o el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno es un scFv. En determinadas modalidades, el primer fragmento de TCR de unión al antígeno y el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno son cada uno un scFv. En determinadas modalidades, el primer fragmento de TCR de unión al antígeno o el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno es un Fab. En determinadas modalidades, el primer fragmento de TCR de unión al antígeno y el segundo fragmento de TCR de unión al antígeno son cada uno un Fab.

[0121] Los F4-TriNKET con fragmentos de TCR de unión al antígeno proporcionados en la presente proporcionan una interacción bivalente de los antígenos (*por ejemplo*, péptidos de TAA presentados por MHC), lo que estabiliza y mantiene de este modo el péptido de TAA en la superficie de las células cancerosas y mejora la citotoxicidad de los linfocitos NK hacia las células cancerosas. En algunas modalidades, la interacción bivalente de los péptidos del TAA mediante las proteínas de unión multiespecíficas confiere una mayor avidéz de las proteínas de unión multiespecíficas a las células cancerosas, lo que facilita de este modo una respuesta citotóxica más potente de los linfocitos NK hacia las células cancerosas, especialmente hacia las células cancerosas que presentan un nivel bajo del péptido del TAA.

[0122] Se entiende que cuando la proteína de la presente invención comprende un scFv, la V_H se puede colocar en el extremo C o en el extremo N de V_L. De manera similar, cuando la proteína de la presente invención comprende un fragmento de scTCR, la V_α puede colocarse en el extremo C o en el extremo N de V_β.

[0123] Se enumeran en la presente secuencias de ejemplo de un sitio de unión a NKG2D y un sitio de unión al antígeno asociado al tumor o fragmentos de TCR de unión al antígeno, que pueden incorporarse en los F3/F3' y F4-TriNKET.

Sitio de unión a NKG2D

[0124] La Tabla 1 enumera las secuencias de péptidos de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, combinados,

pueden unirse a NKG2D. A menos que se indique algo diferente, las secuencias de CDR proporcionadas en la Tabla 1 se determinan según Kabat. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están dispuestos en formato Fab. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se fusionan para formar un scFv.

[0125] Los dominios de unión a NKG2D pueden variar en su afinidad de unión a NKG2D, sin embargo, todos activan NKG2D y los linfocitos NK humanos.

Tabla 1		
Clones	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada	Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1: GSFSGYYWS (no de Kabat) (SEQ ID NO:3) o GYYWS (SEQ ID NO:307) CDR2: EIDHSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO:4) CDR3: ARARGPWSFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:5) o ARGPWSFDP (SEQ ID NO:308)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:7)

ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYHSFYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQSNSYYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:11)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYNSYPTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWGFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCRTSQSISSYLNWYQQKPG QPPKLLIYWASTRESGVPDFR SGSGSGTDFTLTISLQPEDS ATYYCQQSYDIPYTFGQGTKL EIK (SEQ ID NO:15)
ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:16)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYGSFPITFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK

	GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:18)	APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPDDFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEI K (SEQ ID NO:19)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:22)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDIPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY

	RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	YCQQYQSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYSSFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:31)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:33)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:35)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37)
ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:39)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT

	YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)	CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYELYSYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:41)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDTFITFGGKVEIK (SEQ ID NO:43)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR GDSSIRHAYYYYGMDVWGQGTITV VSS (SEQ ID NO:44) CDR1: GTFSSYAIS (no de Kabat) (SEQ ID NO:45) o SYAIS (SEQ ID NO:309) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:46) CDR3: ARGDSSIRHAYYYYGMDV (no de Kabat) (SEQ ID NO:47) o GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:310)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQYYSTPITFG GGKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1: KSSQSVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:49) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:50) CDR3: QQYYSTPIT (SEQ ID NO:51)
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS GGSISSSSYYWGWRQPPGKGLEW IGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR GSDRFHPYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQFDTWPPTFGGKVEIK (SEQ ID NO:56)

	CDR1: GSISSSSYYWG (no de Kabat) (SEQ ID NO:53) o SSSYYWG (SEQ ID NO:311) CDR2: SIYYSGSTYYNPSLKS (SEQ ID NO:54) CDR3: ARGSDRFHPYFDY (no de Kabat) (SEQ ID NO:55) o GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:312)	CDR1: RASQSVSRYLA (SEQ ID NO:57) CDR2: DASNRAT (SEQ ID NO:58) CDR3: QQFDTWPPT (SEQ ID NO:59)
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAY YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWI GEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARA RGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFFSSYAISWVRQAPGQGLEW MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR RGRKASGSFYFYYGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:62) CDR1: GTFSSYAIS (no de Kabat) (SEQ ID NO:63) CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO:64) CDR3: ARRGRKASGSFYFYYGMDV (no de Kabat) (SEQ ID NO:65)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLNLSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKPLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQNDYSYPYTF GQGTKLEIK (SEQ ID NO:66) CDR1: ESSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO:67) CDR2: WASTRES (SEQ ID NO:68) CDR3: QNDYSYPYT (SEQ ID NO:69)
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTSYMHWRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC ARGAPNYGDTTHDYYMDVWGKG	EIVMTQSPATLSVSPGERATL SCRASQSVSSNLAWYQQKPG QAPRLIYGASTRATGIPARFS GSGSGTEFTLTISLQSEDFAV YYCQQYDDWPFTFGGGTKVE

	TTVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1: YTFTSYMH (no de Kabat) (SEQ ID NO:71) o SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:72) CDR3: ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (no de Kabat) (SEQ ID NO:73) o GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:314)	IK (SEQ ID NO:74) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:75) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:76) CDR3: QQYDDWPFT (SEQ ID NO:77)
ADI-29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEW MGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTM TRDTSISTAYMELSRSDDTAVYY CARDTGEYYDTDDHGMDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:78) CDR1: YTFTGYMH (no de Kabat) (SEQ ID NO:79) o GYMH (SEQ ID NO:315) CDR2: WINPNSGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO:80) CDR3: ARDTGEYYDTDDHGMDV (no de Kabat) (SEQ ID NO:81) o DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:316)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:82) CDR1: RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:83) CDR2: GASTRAT (SEQ ID NO:84) CDR3: QQDDYWPPT (SEQ ID NO:85)
ADI-27744 (A44)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDGGYYDSGAGDYWGQGTLVTV SS	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTI TCRASQGIDSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQGVSYPRTEFGGGTKVEI K

	(SEQ ID NO:86) CDR1: FTFSSYAMS (no de Kabat) (SEQ ID NO:87) o SYAMS (SEQ ID NO:317) CDR2: AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:88) CDR3: AKDGGYYDSGAGDY (no de Kabat) (SEQ ID NO:89) o DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:318)	(SEQ ID NO:90) CDR1: RASQGIDSWLA (SEQ ID NO:91) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:92) CDR3: QQGVSYPRRT (SEQ ID NO:93)
ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPMGAAAGWFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:94) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPMGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:97) o GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:320)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQGVSPRTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
ADI-29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCA SGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEW MGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMT RDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC AREGAGFAYGMDYYYMDVWGKGT TVTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1: YTFTSYMH (no de Kabat)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSG SSGSGTDFTLTISLQPEDFAVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) -

	(SEQ ID NO:103) o SYMH (SEQ ID NO:313) CDR2: IINPSGGSTSYAQKFQG (SEQ ID NO:104) CDR3: AREGAGFAYGMDYYYMDV (no de Kabat) (SEQ ID NO:105) o EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:321)	RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPIGAAAGWFDPWGQGTLVTVS S (SEQ ID NO:322) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPIGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:323) o GAPIGAAAGWFDP (SEQ ID NO:324)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQGVSPRTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49MQ	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPQGAAAGWFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:325) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SSSSSSYIYYADSVKG	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFAT YYCQQGVSPRTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID

	(SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPQGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:326) o GAPQGAAAGWFDP (SEQ ID NO:327)	NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GAPLGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:328) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPLGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:329) o GAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:330)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GAPFGAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:331) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPFGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:332) o	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)

	GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:333)	
A49MV	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPVGAAAGWFDPWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:334) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPVGAAAGWFDP (no de Kabat) (SEQ ID NO:335) o GAPVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:336)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQGVSPRTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)
A49- consenso	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPXGAAAGWFDPWGQGTLVTV SS, en donde X es M, L, I, V, Q o F (SEQ ID NO:337) CDR1: FTFSSYSMN (no de Kabat) (SEQ ID NO:95) o SYSMN (SEQ ID NO:319) CDR2: SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO:96) CDR3: ARGAPXGAAAGWFDP, en donde X es M, L, I, V, Q o F (no de Kabat) (SEQ ID NO:338) o GAPXGAAAGWFDP, en donde X es	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITI TCRASQGISSWLAWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQGVSPRTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO:98) CDR1: RASQGISSWLA (SEQ ID NO:99) CDR2: AASSLQS (SEQ ID NO:100) CDR3: QQGVSPRT (SEQ ID NO:101)

	M, L, I, V, Q o F (SEQ ID NO:339)	
--	-----------------------------------	--

[0126] Alternativamente, un dominio variable de la cadena pesada representado por la SEQ ID NO:110 puede emparejarse con un dominio variable de la cadena ligera representado por la SEQ ID NO:111 para formar un sitio de unión al antígeno que puede unirse a NKG2D, como se ilustra en el documento US 9 273 136.

SEQ ID NO:110

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFD
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPS
GVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0127] Alternativamente, un dominio variable de la cadena pesada representado por la SEQ ID NO:112 se puede emparejar con un dominio variable de la cadena ligera representado por la SEQ ID NO: 113 para formar un sitio de unión al antígeno que puede unirse a NKG2D, como se ilustra en el documento US 7 879 985.

SEQ ID NO:112

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGS
ANYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTV
VSS

SEQ ID NO:113

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

Sitio de unión al antígeno asociado al tumor

[0128] El antígeno asociado al tumor que se usa en la presente significa cualquier antígeno que incluya, de modo no taxativo, una proteína, glucoproteína, gangliósido, carbohidrato o lípido que esté asociado al cáncer. Dicho antígeno puede expresarse en células malignas o en el microambiente tumoral, como en los vasos sanguíneos asociados a tumores, la matriz extracelular, el estroma mesenquimatoso o los infiltrados inmunitarios. Por ejemplo, el antígeno asociado al tumor puede incluir ANO1, BCMA, EpCAM, CAIX, CEA, CCR4, CD2, CD123, CD133, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD70, CLAUDIN-18.2,

- DLL3, EGFR/ERBB1, GD2, IGF1R, HER2, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSMA, mesotelina, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, TROP2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4, PD1, 5T4, GPNMB, FR-alfa, PAPP-A, FLT3, GPC3, CXCR4, ROR1, ROR2, HLA-E, PD-L1, VLA4, CD44, CD13, CD15, CD47, CLL1, CD81, CD23, CD79a, CD79b, CD80, CRLF2, SLAMF7, CD138, CA125, NaPi2b, nectina 4, ADAM8, ADAM9, SLC44A4, CA19-9, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, ULRA 1, LILRA2, LILRA3, ULRA4, LILRA5 y ULRA6, CCR8, CD7, CTLA4, CX3CR1, ENTPD1, HAVCR2, IL-1R2, PDCD1LG2, TIGIT, TNFRSF4, TNFRSF8, TNFRSF9, GEM, NT5E, TNFRSF18, MUC1, P-cadherina, plexina A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, Ax1, erbB-3, EDNRB, Tyrp1, CD14, CD163, CSF3R, Siglec-9, ITGAM, VISTA, B7-H4 (VTCN1), CCR1, LRRC25, PTAFR, SIRPB1, TLR2, TLR4, CD300LB, ATP1A3, CCR5, MUC1 (o MUC1-C), plexina A1, TNFRSF10B, STEAP1, CDCP1, PTK7, AXL, EDNRB, OLR1 y TYRP1 que se expresen en las células cancerosas.
- [0129]** Puede crearse un sitio de unión al antígeno asociado al tumor para unirse a cualquier antígeno asociado al tumor. En algunas modalidades, el sitio de unión al antígeno asociado al tumor incluye un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera, que pueden emparejarse para unirse a un antígeno asociado al tumor. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera están dispuestos en formato Fab. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se fusionan para formar un scFv. A continuación se enumeran ejemplos de sitios de unión al antígeno asociados al tumor.
- [0130]** En la Tabla 2 se enumeran las secuencias de péptidos de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, combinados, pueden unirse a BCMA.

Tabla 2		
Clones	Secuencia de péptidos del dominio variable de la cadena pesada	Secuencia de péptidos del dominio variable de la cadena ligera
1 (US14/776 649)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYSFPDYYINWVRQAPGQG LEWMGWIYFASGNSEYNQKFTG	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISCK SSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSG

	RVTMTRDTSSSTAYMELSSLRSE DTAVYFCASLYDYDWYFDVWGQ GTMVTVSS (SEQ ID NO:114) CDR1(SEQ ID NO:115) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:116) - WIYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:117) - LYDYDWYFDV	SGSGADFTLKISRVEAEDVGVYY CAETSHVPWTFGQGCKLEIK (SEQ ID NO:118) o DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKP GQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YCSQSSIYPWTFGQGCKLEIK (SEQ ID NO:119) CDR1(SEQ ID NO:120) - KSSQSLVHSNGNTYLH CDR2 (SEQ ID NO:121) - KVSNRFS CDR3 - AETSHVPWT (SEQ ID NO:122) o SQSSIYPWT (SEQ ID NO:123)
2 (PCT/US1 5/64269)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA SGYTFTDYSINWVKRAPGKGLK WMGWINTETREPAYAYDFRGRF AFSLETSASTAYLQINNLYEDTA TYFCALDYSYAMDYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:124) CDR1 (SEQ ID NO:125) - DYSIN CDR2 (SEQ ID NO:126) - WINTETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:127) - DYSYAMDY	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCR ASESVTILGSHLIHWYQQKPGQP PTLLIQLASNVQTGVPARFSGSG SRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCL QSRTIPRTFGGCKLEIK (SEQ ID NO:128) CDR1 (SEQ ID NO:129) - RASESVTILGSHLIH CDR2 (SEQ ID NO:130) - LASNVQT CDR3 (SEQ ID NO:131) - LQSRTIPRT
3 (US14/122 391)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSNYWMHWVRQAPGQ GLEWMGATYRGHSDTYYNQKFK GRVTITADKSTSTAYMELSSLRS	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPK LLIYYTSNLSHGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY

	EDTAVYYCARGAIYNGYDVLDN WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:132) CDR1 (SEQ ID NO:133) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:134) - ATYRGHSDTYYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:135) - GAIYNGYDVLDN	RKLPWTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:136) CDR1 (SEQ ID NO:137) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:138) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:139) - QQYRKLPWT
4 (US20170 051068)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCT VSGGSISSSSYFWGWIRQPPGK GLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS TISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARHDGATAGLFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:140) CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:141) CDR2: SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO:142) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:143)	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCG GNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVV VYDDSDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:144) CDR1: GNNIGSKSVH (SEQ ID NO:145) CDR2: DDSDRPS (SEQ ID NO:146) CDR3: QVWDSSSDHV (SEQ ID NO:147)
5 (WO2017 021450)	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSC AASGFTFSDNAMGWVRQAPGK GLEWVSAISGPSSTYYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKVLGWFYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:148) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:149) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:150)	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSC RASQSVSDEYLSWYQQKPGQA PRLIHSASTRATGIPDRFSGSG SGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQ QYGYPDFTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:152) CDR1: RASQSVSDEYLS (SEQ ID NO:153) CDR2: SASTRAT (SEQ ID NO:154)

	CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:151)	CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:155)
--	----------------------------------	----------------------------------

[0131] Alternativamente, un dominio de unión a BCMA puede incluir un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera como se enumera a continuación en EM-801 y EM-901.

5 Dominio variable de la cadena pesada de EM-801 (SEQ ID NO:157):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG
G

CDR1

CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTL

10

CDR3

VTVSS

Dominio variable de la cadena ligera de EM-801 (SEQ ID NO:158):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT
 15 GI

CDR1

CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

CDR3

Dominio variable de la cadena pesada de EM-901 (SEQ ID NO:159)

20 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGP
GS

CDR1

CDR2

STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTL

CDR3

VTVSS

25

Dominio variable de la cadena ligera de EM-901 (SEQ ID NO:160)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRAT
 GI

CDR1

CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGTKVEIK

30

CDR3

[0132] Alternativamente, los sitios de unión al antígeno novedosos que pueden unirse a BCMA pueden identificarse mediante el cribado de la unión a la secuencia

de aminoácidos definida por la SEQ ID NO:156.

SEQ ID NO:156

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAIL
WTCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEILP
5 RGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSHCFPLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALS
ATEIEKSISAR

- [0133]** En la Tabla 3 se enumeran las secuencias de péptidos de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, combinados, pueden unirse a CD33. Los dominios de unión a CD33 pueden variar en su afinidad de unión a CD33.

Tabla 3		
	Secuencia de péptidos del dominio variable de la cadena pesada	Secuencia de péptidos del dominio variable de la cadena ligera
ADI-10159 [Ab1] (G59)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYGMSWVRQAPG KGLEWVANIKQDGSEKYYVDS VKGRFTISRDNANKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAREGGPYYS SGYFVYYGMDVWGQGTTVTVS S [SEQ ID NO:161] CDR1: FTFSSYGMS [SEQ ID NO:162] CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:163] CDR3: AREGGPYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:164]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ YESFPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:165] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:166] CDR2: DASSLES [SEQ ID NO:167] CDR3: QQYESFPT [SEQ ID NO:168]
ADI-10177 [Ab2]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYEASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ

	SLRAEDTAVYYCARPLNAGELD VWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO:169] CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:170] CDR2: NIKQDGSEKYYVDSVKG [SEQ ID NO:171] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:172]	LESYPLTFGGGKVEIK [SEQ ID NO:173] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:174] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:175] CDR3: QQLESYPLT [SEQ ID NO:176]
ADI-11776 [Ab3] (H76)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSKYTMSWVRQAPG KGLEWVSAIVGSGESTYFADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREGGPYYDSS GYFVYYGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:177] CDR1: FTFSKYTMS [SEQ ID NO:178] CDR2: AIVGSGESTYFADSVKG [SEQ ID NO:179] CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:180]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQ YDDLPTFGGGKVEIK [SEQ ID NO:181] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:182] CDR2: KASSLES [SEQ ID NO:183] CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:184]
ADI-11801 [Ab4]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFSDYYMHWVRQAP GQGLEWMGMINPSWGSTSYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAREAADGF VGERYFDLWGRGTLTVTVSS [SEQ ID NO:185] CDR1: YTFSDYYMH [SEQ ID NO:186] CDR2:	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKP GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCMQDVALPITFGGGKVEIK [SEQ ID NO:189] CDR1: RSSQSLLYSNGYNYLD [SEQ ID NO:190] CDR2: LGSNRAS [SEQ ID NO:191]

	MINPSWGSTSYAQKFQG [SEQ ID NO:187] CDR3: AREAADGFVGERYFDL [SEQ ID NO:188]	CDR3: MQDVALPIT [SEQ ID NO:192]
ADI-11807 [Ab5] (I07)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGSYWMSWVRQAP GKGLEWVATIKQDGSEKSYVD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARPLNAGELD VWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO:193] CDR1: FTFGSYWMS [SEQ ID NO:194] CDR2: TIKQDGSEKSYVDSVKG [SEQ ID NO:195] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:196]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYEASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ SQSYPPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:197] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:198] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:199] CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:200]
ADI-11809 [Ab6]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFPSYWMSWVRQAP GKGLEWVATIKRDGSEKGYVD SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARPLNAGELD VWGQGTMTVTVSS [SEQ ID NO:201] CDR1: FTFPSYWMS [SEQ ID NO:202] CDR2: TIKRDGSEKGYVDSVKG [SEQ ID NO:203] CDR3: ARPLNAGELDV [SEQ ID NO:204]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYEASSLESGVPSRFSGSGS GTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQ SQSYPPITFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:205] CDR1: RASQSISSWLA [SEQ ID NO:206] CDR2: EASSLES [SEQ ID NO:207] CDR3: QQSQSYPPIT [SEQ ID NO:208]
ADI-11815 [Ab7]	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFGTYYMHWVRQAP GQGLEWMGIINPSRGSTVYAQ	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGIDSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS

	KFQGRVTMTRDTSTSTVYMEL SSLRSEDNAVYYCARGAGYDD EDMDVWGKGTTTVTVSS [SEQ ID NO:209] CDR1: YTFGTYYMH [SEQ ID NO:210] CDR2: IINPSRGSTVYAQKFQG [SEQ ID NO:211] CDR3: ARGAGYDDEDMDV [SEQ ID NO:212]	GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ AHSYPLTFGGGKTKVEIK [SEQ ID NO:213] CDR1: RASQGIDSWLA [SEQ ID NO:214] CDR2: AASSLQS [SEQ ID NO:215] CDR3: QQAHSYPLT [SEQ ID NO:216]
ADI-11819 [Ab8]	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSSISSSSEGIYYADSV KGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDNAVYYCAREGGPYYDSS GYFVYYGMDVWGQGTTTVTVSS [SEQ ID NO:217] CDR1: FTFSSYAMS [SEQ ID NO:218] CDR2: SISSSSEGIYYADSVKG [SEQ ID NO:219] CDR3: AREGGPYYDSSGYFVYYGMDV [SEQ ID NO:220]	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC RASNSISSWLAWYQQKPGKAPK LLIYEASSTKSGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPDDEFATYYCQQY DDLPTFGGGKTKVEIK [SEQ ID NO:221] CDR1: RASNSISSWLA [SEQ ID NO:222] CDR2: EASSTKS [SEQ ID NO:223] CDR3: QQYDDLPT [SEQ ID NO:224]
ADI-11830 [Ab9]	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANINTDGSEVYYVD SVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDNAVYYCARDVGPGIAY QGHFDYWGGGTLTVTVSS [SEQ ID NO:225] CDR1: FTFSSYWMS [SEQ ID NO:226]	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RASQVIYSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLKSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQV YDTPLTFGGGKTKVEIK [SEQ ID NO:229] CDR1: RASQVIYSYLN [SEQ ID NO:230] CDR2: AASSLK [SEQ ID

	CDR2: NINTDGSEVYYVDSVKG [SEQ ID NO:227] CDR3: ARDVGPGLIAYQGHFDY [SEQ ID NO:228]	NO:231] CDR3: QQVYDTPLT [SEQ ID NO:232]
ADI-11835 [Ab10] (I35)	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTC TVSGGSISSTDYYWGWIRQPP GKGLEWIGSIGYSGTYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARETAHDVHGMDV WGQGTTVTVSS [SEQ ID NO:233] CDR1: GSISSTDYYWG [SEQ ID NO:234] CDR2: SIGYSGTYYNPSLKS [SEQ ID NO:235] CDR3: ARETAHDVHGMDV [SEQ ID NO:236]	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASHSVYSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQ YDNLPTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO:237] CDR1: RASHSVYSYLA [SEQ ID NO:238] CDR2: DASNRRAT [SEQ ID NO:239] CDR3: QQYDNLPT [SEQ ID NO:240]
Lintuzumab	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVS CKASGYTFTDYNMHWVRQAP GQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQ KFKSKATITADESTNTAYMELSS LRSEDTAVYYCARGRPAMDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:241) CDR1 (SEQ ID NO:242) - GYTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:243) - YIYPYNGGTG CDR3 (SEQ ID NO:244) - GRPAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASESVDNYGISFMNWFQQKP GKAPKLLIYAASNQGSQVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPDFFAT YYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:245) CDR1(SEQ ID NO:246) - ESVDNYGISFMN CDR2 (SEQ ID NO:247) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:248) - QQSKEVPWT
Gemtuzumab	EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVS CKASGYTITDSNIHWVRQAPGQ SLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFK	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITC RASESLDNYGIRFLTWFAQKPG KAPKLLMYAASNQGSQVPSRFS

	NRATLTVDNPTNTAYMELSSLR SEDTAFYYCVNGNPWLAYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO:249) CDR1 (SEQ ID NO:250) - GYTITDS CDR2 (SEQ ID NO:251) - YIYPYNGGTD CDR3 (SEQ ID NO:252) - GNPWLAY	GSGSGTEFTLTISLQPDDFATY YCQQTKEVPWSFGQGTKVEVK (SEQ ID NO:253) CDR1 (SEQ ID NO:254) - ESLDNYGIRFLT CDR2 (SEQ ID NO:255) - AASNQGS CDR3 (SEQ ID NO:256) - QQTKEVPWS
anti-CD33 (US 7 557 189)	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMS CKASGYTFTSYIHWIKQTPGQ GLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQ GKATLTADKSSTTAYMQLSSLT SEDSAVYYCAREVRLRYFDVW GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:257) CDR1 (SEQ ID NO:258) - GYTFTSY CDR2 (SEQ ID NO:259) - YPGNDD CDR3 (SEQ ID NO:260) - EVRLRYFDV	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMS CKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQ QIPGQSPRLLIYWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDL AIYYCHQYLSSRTFGQGKLEIK R (SEQ ID NO:261) CDR1 (SEQ ID NO:262) - QSVFFSSSQKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:263) - WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:264) - HQYLSSRT
vadastuxima b (US 13/804 227)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTNYDINWVRQAPG QGLEWIGWIYPGDGSTKYNEK FKAKATLTADTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCASGYEDAMDY WGQGTTVTVSSA (SEQ ID NO:265) CDR1 (SEQ ID NO:266): GYTFTNY CDR2 (SEQ ID NO:267):	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINC KASQDINSYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANRLVDGVPSRFSGSGS GQDYTLTISLQPEDFATYYCLQ YDEFPLTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO:269) CDR1 (SEQ ID NO:270): QDINSYLS CDR2 (SEQ ID NO:271): RANRLVD

	YPGDGS CDR3 (SEQ ID NO:268): GYEDAMDY	CDR3 (SEQ ID NO:272): LQYDEFPLT
--	---	------------------------------------

[0134] Alternativamente, se pueden identificar sitios de unión al antígeno novedosos que pueden unirse a CD33 mediante el cribado de la unión a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO:273.

5 SEQ ID NO:273

MPLLLLLLPLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYYDKNSPV
HGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRL LGDPSRNNCSLSIVDARRRD
NGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTCVSWA
CEQGT PPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTER
10 TIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVK
THRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEEL
HYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ

[0135] La Tabla 4 enumera las secuencias de péptidos de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, combinados,
15 pueden unirse a HER2.

Tabla 4		
Clones	Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada	Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera
Trastuzuma b	EVQLVESGGGLVQP GGSRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:274) CDR1(SEQ ID NO:275) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:276) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:277) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQG GTKVEIK (SEQ ID NO:278) CDR1(SEQ ID NO:279) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:280) - SASFLYS CDR3 (SEQ ID NO:281) -

		QQHYTTPPT
Pertuzuma b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGL EWWADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSDVDRSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTL VTVSSA (SEQ ID NO:282) CDR1 (SEQ ID NO:283) - GFTFTDY CDR2 (SEQ ID NO:284) - NPNSGG CDR3 (SEQ ID NO:285) - NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVIT CKASQDVSIGVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYYIYPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:286) CDR1 (SEQ ID NO:287) - QDVSIGVA CDR2 (SEQ ID NO:288) - SASYRYT CDR3 (SEQ ID NO:289) - QQYYIYPYT
MGAH22 (US 8 802 093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLST ASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLE WIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATI TADTSSNTAYLQVSRLTSEDVAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGAS VTVSSA (SEQ ID NO:290) CDR1 (SEQ ID NO:291) - GFNIKDT CDR2 (SEQ ID NO:292) - YPTNGY CDR3 (SEQ ID NO:293) - WGGDGFYAMDY	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIT CKASQDVNTAVAWYQQKPGH SPKLLIYSASFRTGVDPDRFTG SRSGTDFFTISSVQAEDLAVY YCQQHYTTPPTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:294) CDR1 (SEQ ID NO:295) - QDVNTAVA CDR2 (SEQ ID NO:296) - SASFRTY CDR3 (SEQ ID NO:297) - QQHYTTPPT

[0136] Alternativamente, se pueden identificar sitios de unión al antígeno novedosos que pueden unirse a HER2 mediante el cribado de la unión a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 298.

- 5 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQV
VQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNPVRQVPLQRLRIVRGTLQFEDNY
ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILW

KDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGC
 ARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNFHSGICELHCPALVTYNTDTFE
 SMPNPEGRYTFGASCVTACPYNLSTDVGSCTLCPLHNQEVTAEEDGTQRCEKCS
 KPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPL
 5 QPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGI
 SWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVG
 EGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARH
 CLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSPYMPI
 WKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVV
 10 FGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGS
 GAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRL
 GICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIKAGMSYLEDVRLV
 HRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVKPIKWMALLESILRRRFT
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVK
 15 CWMIDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNEGLPASPLDSTFYRSLLLEDD
 MGDLDVAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSE
 EEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPS
 ETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGK
 NGVVKDVFAFGGAVENPEYLTQGGGAAPQPHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERG
 20 APPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV (SEQ ID NO:298).

[0137] Puede crearse un fragmento de TCR de unión al antígeno que se una a un péptido del antígeno asociado al tumor presentado por un MHC. En algunas modalidades, el fragmento de TCR de unión al antígeno incluye un dominio variable de la cadena alfa y un dominio variable de la cadena beta, que pueden emparejarse para unirse a un péptido de TAA presentado por un MHC. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena alfa y el dominio variable de la cadena beta están dispuestos en el formato de fragmento de TCR extracelular. En algunas modalidades, el dominio variable de la cadena alfa y el dominio variable de la

30 **[0138]** Los ejemplos no taxativos de proteínas que pueden procesarse en péptidos de TAA dirigidos a TCR incluyen antígenos de diferenciación de tejidos (*por ejemplo*, MART-1, gp100, CEA, CD19 y tirosinasa), antígenos de la estirpe germinal tumoral (*por ejemplo*, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, CTAG1, CTAG2, XAGE-1B y SSX2), proteínas normales

sobreexpresadas por células cancerosas (*por ejemplo*, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 y mesotelina), proteínas virales (*por ejemplo*, HPV, EBV y MCC) y antígenos mutados específicos de tumores. A continuación se enumeran ejemplos de sitios de unión al antígeno asociados al tumor.

- 5 **[0139]** En la Tabla 5 se enumeran las secuencias de péptidos de las dianas de TCR y las correspondientes secuencias de la cadena alfa y de la beta de TCR.

Tabla 5		
Proteína diana y péptido presentado por MHC	Fragmento extracelular de TCR α Dominio variable de cadena α (V α) CDR3 de la cadena α (CDR3 α)	Fragmento extracelular de TCR-beta dominio variable de la cadena β (V β) CDR de la cadena β (CDR3 β)
ELAVL4 (código de UniProt P26378) LGYGFVNYI (SEQ ID NO:425) presentado por HLA-A*02:01:48	KEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSSQFFWYRQY SGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDS QPSDSATYLCVTTDSWGK LQFGAGTQVVVTPDIQNP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:349) V α : KEVEQNSGPLSVPEGAIASL NCTYSDRGSSQFFWYRQY SGKSPELIMSIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDS QPSDSATYLCVTTDSWGK LQFGAGTQVVVTPDIQNP (SEQ ID NO:351) CDR3 α : CAVTTDSWGK LQF	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMG LRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSV YFCASRPGLAGGRPEQYFGPG TRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYPDH VELSWWWNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYALSSRLRVS ATFWQDPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRAD (SEQ ID NO:350) V β : NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMG LRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYN VSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSV YFCASRPGLAGGRPEQYFGPG TRLTVTEDLKNVF (SEQ ID NO:352)

	(SEQ ID NO:353)	CDR3 β : CASRPGLAGGRPEQYF (SEQ ID NO:354)
Insulina (código de UniProt P01308) ALWGPDPA (SEQ ID NO:426) presentado por HLA-A*02:01:48	EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMRGDSSYK LIFGSGTRLLVRPDIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KCVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPS (SEQ ID NO:355) V α : EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMRGDSSYK LIFGSGTRLLVRPDIQNP (SEQ ID NO:357) CDR3 α : CAMRGDSSYKLIF (SEQ ID NO:359)	AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDS AVYFCASSLWEKLAKNIQYFG AGTRLSVLEDLKNVFPPEVAV FEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWVNGKEVHSG VCTDPQPLKEQPALNDSRYAL SSRLRVSATFWQDPRNHFRCQ VQFYGLSENDEWEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:356) V β : AGVIQSPRHEVTEMGQQVTLRC KPISGHDYLFWYRQTMMRGLEL LIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDS AVYFCASSLWEKLAKNIQYFG AGTRLSVLEDLKNV (SEQ ID NO:358) CDR3 β : CASSLWEKLAKNIQYF (SEQ ID NO:360)
TERT (código de UniProt O14746) ILAKFLHWL (SEQ ID NO:340) presentado por HLA-A*02:01:48	IQVEQSPDLILQEGANSTL RCNFSDSVNNLWWFHQNP WGQLINLFYIPSGTKQNGRL SATTVATERYSLYISSQTT DSGVYFCAVDSATALPYGYI FGTGTRLKVLANIQNPDAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDK CVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYQGTEAFFGQGTRLT VVEDLNKVPPEVAVFEPSEAE ISHITQKATLVCLATGFYPDH VELSWWVNGKEVHSGVCTDP QPLKEQPALNDSRYALSSRLR VSATFWQDPRNHFRCQVQFY GLSENDEW

	TFFPS (SEQ ID NO:361) Vα: IQVEQSPDLILQEGANSTL RCNFSDSVNNLWWFHQNP WGQLINLFYIPSGTKQNGRL SATTVATERYSLLYISSSQT DSGVYFCAVDSATALPYGYI FGTGTRLKVLANIQNP (SEQ ID NO:363) CDR3α: CAVDSATALPYGYIF (SEQ ID NO:365)	TQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:362) Vβ: AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQC AQDMNHEYMSWYRQDPGMGL RLIHYSIHPEYTDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYQGTEAFFGQGTRLTVV EDLNKVF (SEQ ID NO:364) CDR3β: CASSYQGTEAFF (SEQ ID NO:366)
ERBB2 (código de UniProt P04626) KIFGSLAFL (SEQ ID NO:341) presentado por HLA-A*02	EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMSLYYGGS QGNLIFGKGTKLSVKPDAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDK CVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:428) Vα: EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMSLYYGGS QGNLIFGKGTKLSVKP (SEQ ID NO:430) CDR3α: CAMSLYYGGSQGNLIF	AGVAQSPRYKIIKRQSVAFWC NPISGHATLYWYQQILGQGPKLL IQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAE RLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL CASSLEIFGGIADTDQYFGPGT RLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHV ELSWWWNGKEVHSGVCTDPQP LKEQPALNDSRYALSSRLRVSA TFWQDPRNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAW GRAD (SEQ ID NO:429) Vβ: AGVAQSPRYKIIKRQSVAFWC NPISGHATLYWYQQILGQGPKLL IQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAE RLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL CASSLEIFGGIADTDQYF GPGTRLTVLEDLKNVF (SEQ ID NO:431) CDR3β:

	(SEQ ID NO:367)	CASSLEIFGGIADTDQYF (SEQ ID NO:368)
WT1 (código de UniProt P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) presentado por HLA-A*02	EVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMFIYSNGDKEDGR FTAQLNKASQYVSLLIRDSQ PSDSATYLCVNDQGGGAD GLTFGKGTHLIIQPDPAVYQ LRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKCVL DMRSMDFKSNSAFAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFP S (SEQ ID NO:432) V α : EVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMFIYSNGDKEDGR FTAQLNKASQYVSLLIRDSQ PSDSATYLCVNDQGGGAD GLTFGKGTHLIIQ (SEQ ID NO:434) CDR3 α : CAVNDQGGGADGLTF (SEQ ID NO:369)	NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGY NVSRLKKQNFLLGLESAAPSQT SVYFCASSWWDTGELFFGEGS RLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYDPDHV ELSWWVNGKEVHSGVCTDPQP LKEQPALNDSRYALSSRLRVSA TFWQDPRNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAW GRAD (SEQ ID NO:433) V β : NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLL CAQDMNHEYMYWYRQDPGMG LRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGY NVSRLKKQNFLLGLESAAPSQT SVYFCASSWWDTGELFFGEGS RLTVLEDLKNVF (SEQ ID NO:435) CDR3 β : CASSWWDTGELFF (SEQ ID NO:370)
WT1 (código de UniProt P19544) RMFPNAPYL (SEQ ID NO:342) presentado por HLA-A*02	AQSVTQLGSHVSVSEALV LLRCNYSSSVPPYLFWYVQ YPQGLQLLLKYTSAATLVKG INGFEAEFKKSETSFHLTKP SAHMSDAAEYFCAVSEGGD YKLSFGAGTTVTVRADPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKCV LDMRSMDFKSNSAFAWSN	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLG LRLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYS VSREKKERFSLILESASTNQTSM YLCWGTATEQYFGPGTRLTV TEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFYDPDHVELS WWVNGKEVHSGVCTDPQPLKE QPALNDSRYALSSRLRVSATFW

	KSDFACANAFNNSIIPEDTFF PS (SEQ ID NO:436) Vα: AQSVTQLGSHVSVSEGALV LLRCNYSSSVPPYLFWYVQ YPQGLQLLLKYTSAATLVKG INGFEAEFKKSETSFHLTKP SAHMSDAAEYFCAVSEGGD YKLSFGAGTTVTVRA (SEQ ID NO:438) CDR3α: CAVSEGGDYKLSF (SEQ ID NO:371)	QDPRNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA D (SEQ ID NO:437) Vβ: DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL E CVQDMDHENMFWYRQDPGLG LRLIYFSYDVKMKEKGDIP EGYS VSREKKERFSLILESASTNQT SM YLCAWGTLATEQYFGPGTRL TV TEDLKNVF (SEQ ID NO:439) CDR3β: CAWGTATEQYF (SEQ ID NO:372)
MAGE-A3 (código de UniProt P43357) CASSFNMATG QYF (SEQ ID NO:343) presentado por HLA-A1	AQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLYVRPYQREQT SGRLNASLDKSSGRSTLYIA ASQPGDSATYLCAVRPGGA GPFFVVFVGKGTKLSVIPNIQ NPDPVAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSD VYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNN SIIP (SEQ ID NO:373) Vα: AQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLYVRPYQREQT SGRLNASLDKSSGRSTLYIA ASQPGDSATYLCAVRPGGA GPFFVVFVGKGTKLSVIPNIQ NP (SEQ ID NO:375) CDR3α: CAVRPGGAGPFF (SEQ ID NO:377)	AGVTQTTPRYLIKTRGQQVTLSC SPISGHRVSWYQQTPGQGLQ FLFEYFSETQRNKG NFPGRFSG RQFSNSRSEMNVTLELGDSAL YLCASSFNMATGQYFGPGTRLT VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVSATF WQDPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR AD (SEQ ID NO:374) Vβ: AGVTQTTPRYLIKTRGQQVTLSC SPISGHRVSWYQQTPGQGLQ FLFEYFSETQRNKG NFPGRFSG RQFSNSRSEMNVTLELGDSAL YLCASSFNMATGQYFGPGTRLT VTEDLKNVF (SEQ ID NO:376) CDR3β: CASSFNMATGQYF (SEQ ID NO:378)

MART1 (código de UniProt Q16655) EAAGIGILTV (SEQ ID NO:344) presentado por HLA-A2	EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMSETGGFK TIFGAGTRLFVKANIQNPD AVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:379) Vα: EVEQDPGPLSVPEGAIVSLN CTYSNSAFQYFMWYRQYS RKGPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDS QPSDSATYLCAMSETGGFK TIFGAGTRLFVKANIQNP (SEQ ID NO:381) CDR3α: CAMSETGGFKTIF (SEQ ID NO:383)	EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGL RQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYK VSRKEKRNFPPLILESPSPNQTS LTVTEDLNKVFPPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFPDHVE LSWWWNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWG RAD (SEQ ID NO:380) Vβ: EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGL RQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYK VSRKEKRNFPPLILESPSPNQTS LTVTEDLNKVF (SEQ ID NO:382) CDR3β: CASSLVGTAGSPLHF (SEQ ID NO:384)
SSX2 (código de UniProt Q16385) KASEKIFYV (SEQ ID NO:345) presentado por HLA-A2	CDR3α: CAMTSGFGNEKLTF (SEQ ID NO:387)	CDR3β: CATSRGQGGQPQHF (SEQ ID NO:388)
BIRC5, que se denomina también	GESVGLHLPTLSVQEGDNSI INCAYSNSASDYFIWYKQES GKGPQFIIDIRSNMDKRQGGQ	DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTL CSQTLNHNVMYWYQQKSSQAP KLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQ

survivina (código de UniProt O15392) ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) presentado por HLA-A2	RVTVLLNKTVKHLSQLIAAT QPGDSAVYFCAENCAETVT DSWGKLQFGAGTQVVVTPD PAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:440) Vα: GESVGLHLPTLSVQEGDNSI INCAYSNSASDYFIWYKQES GKGPQFIIDIRSNMDKRQGG RVTVLLNKTVKHLSQLIAAT QPGDSAVYFCAENCAETVT DSWGKLQFGAGTQVVVTP (SEQ ID NO:442) CDR3α: CAETVTDSWGKLQF (SEQ ID NO:389)	SRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAA MYLCATSRGDSTAEPQHFGDG TRLSILEDLNKVFPEVAVFEPS EAEISHTQKATLVCLATGFYPDH VELSWWVNGKEVHSGVCTDPQ PLKEQPALNDSRYALSSRLRVS ATFWQDPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEA WGRAD (SEQ ID NO:441) Vβ: DAMVIQNPRYQVTQFGKPVTL CSQTLNHNVMYWYQQKSSQAP KLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQ SRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAA MYLCATSRGDSTAEPQHFGDG TRLSILEDLNKVF (SEQ ID NO:443) CDR3β: CATSRGDSTAEPQHF (SEQ ID NO:390)
BIRC5, que se denomina también survivina (código de UniProt O15392) ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:346) presentado por HLA-A2	AQKITQTQPGMFVQEKEAV TLDCTYDTSDQSYGLFWYK QPSSGEMIFLIYQGSYDEQN ATEGRYSLNFQKARKSANL VISASQLGDSAMYFCAMRE GGGYNKLIFGAGTRLAVHP DPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKDSDVYI TDKTVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPS (SEQ ID NO:385) Vα: AQKITQTQPGMFVQEKEAV	SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLE CTVEGTSNPPLYWYRQAAGRG LQLLFYSVGIGQISSEVPQNLSA SRPQDRQFILSSKLLLSDSGFY LCAGQDLNTEAFFGQGTRLTVV EDLNKVFPEVAVFEPESEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQ PALNDSRYALSSRLRVSATFWQ DPRNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVQTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:386) Vβ:

	TLDCTYDTS DQSYGLFWYK QPSSGEMIFLIYQGSYDEQN ATEGRYSLNFQKARKSANL VISASQLGDSAMYFCAMRE GGGYNKLIFGAGTRLAVHP (SEQ ID NO:444) CDR3α: CAMREGGGYNKLIF (SEQ ID NO:391)	SQTIHQWPATLVQPVGSPLSLE CTVEGTSNPPLYWYRQAAGRG LQLLFYSVGIGQISSEVPQNLSA SRPQDRQFILSSKKLLLSDSGFY LCAGQDLNTEAFFGQGTRLTVV EDLNKVF (SEQ ID NO:445) CDR3β: CAGQDLNTEAFF (SEQ ID NO:392)
PRAME (código UniProt P78395) QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) presentado por HLA-A2	AQSVTQLGSHVSVSERALV LLRCNYSSSVPPYLFWYVQ YPNQGLQLLLKYTSAATLVK GINGFEAEFKKSETSFHLTK PSAHMSDAAEYFCAVSGQT GANNLFFGTGTRLTVIPYIQ NPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNS AVAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPS (SEQ ID NO:393) Vα: AQSVTQLGSHVSVSERALV LLRCNYSSSVPPYLFWYVQ YPNQGLQLLLKYTSAATLVK GINGFEAEFKKSETSFHLTK PSAHMSDAAEYFCAVSGQT GANNLFFGTGTRLTVIPYIQ NP (SEQ ID NO:395) CDR3α: CAVSGQTGANNLF (SEQ ID NO:397)	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGL QFLIQYYNGEERAKGNILERFSA QQFPDLHSELNLSSLELGDSAL YFCASARWDRGGEQYFGPGTR LTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWWNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTTQIVSAEAWG RAD (SEQ ID NO:394) Vβ: DSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGL QFLIQYYNGEERAKGNILERFSA QQFPDLHSELNLSSLELGDSAL YFCASARWDRGGEQYFGPGTR LTVTEDLKNVF (SEQ ID NO:396) CDR3β: CASARWDRGGEQYF (SEQ ID NO:398)
PRAME (código de UniProt P78395)	GQQLNQSPQSMFIQEGEDV SMNCTSSSIFNTWLWYKQD PGEGPVLLIALYKAGELTSN	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL CVQDMDHENMFWYRQDPGLG LRLIYFSYDVKMKEKGDIPGYS

QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) presentado por HLA-A2	GRLTAQFGITRKDSFLNISAS IPSDVGIFYFCAGIPRDNYGQ NFVFGPGTRLVLPYIQNP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:399) Vα: GQQLNQSPQSMFIQEGEDV SMNCTSSSIFNTWLWYKQD PGEGPVLLIALYKAGELTSN GRLTAQFGITRKDSFLNISAS IPSDVGIFYFCAGIPRDNYGQ NFVFGPGTRLVLPYIQNP (SEQ ID NO:401) CDR3α: CAGIPRDNYGQNFVF (SEQ ID NO:403)	VSREKKERFSLILESASTNQTSM YLCASTPWLAGGNEQFFGPGT RLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAW GRAD (SEQ ID NO:400) Vβ: DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFL CVQDMDHENMFWYRQDPGLG LRLIYFSYDVKMKEKGDIEGYS VSREKKERFSLILESASTNQTSM YLCASTPWLAGGNEQFFGPGT RLTVLEDLKNVF (SEQ ID NO:402) CDR3β: CASTPWLAGGNEQFF (SEQ ID NO:404)
PRAME (código de UniProt P78395) QLLALLPSL (SEQ ID NO:347) presentado por HLA-A2	QKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSSQFFWYRQY SGKSPELIMFIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDS QPSDSATYLCVAVKDNAGNM LTFGGGTRLVMVKPHIQNP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KTVLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPS (SEQ ID NO:405) Vα: QKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSSQFFWYRQY	DSGVTQTPKHLITATGQRVTLR CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGL QFLIQYYNGEERAKGNILERFSA QQFPDLHSELNLSSLELGDSAL YFCASSDGGGVYEQYFGPGTR LTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG RAD (SEQ ID NO:406) Vβ: DSGVTQTPKHLITATGQRVTLR

	SGKSPELIMFIYSNGDKEDG RFTAQLNKASQYVSLIRDS QPSDSATYLCVKNAGNM LTFGGGTRLMVKPHIQNP (SEQ ID NO:407) CDR3 α : CAVKDNAGNMLTF (SEQ ID NO:409)	CSPRSGDLSVYWYQQSLDQGL QFLIQYYNGEERAKGNILERFSA QQFPDLHSELNLSSLELGDSAL YFCASSDGGGVYEQYFGPGTR LTVTEDLKNVF (SEQ ID NO:408) CDR3 β : CASSDGGGVYEQYF (SEQ ID NO:410)
NY-ESO-1 (código de UniProt P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) presentado por HLA-A*02:01:48	QEVTPQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAAS QPGDSATYLCVAVRPTSGGS YIPTFGRGTSLIVHPYIQNP PAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITD KCVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPS (SEQ ID NO:411) V α : QEVTPQIPAALSVPEGENLVL NCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLIQSSQREQTSG RLNASLDKSSGRSTLYIAAS QPGDSATYLCVAVRPTSGGS YIPTFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:413) CDR3 α : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYVGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVSATF WQDPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR AD (SEQ ID NO:412) V β : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYVGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVF (SEQ ID NO:414) CDR3 β : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)
NY-ESO-1 (código de UniProt P78358) SLLMWITQC	KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGGKLTSLLIQSSQREQTS GRLNASLDKSAGSSTLYIAA	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY

(SEQ ID NO:348) presentado por HLA-A*02:01:48	SQPGDSATYLC AVRPTSGG SYIPTFGRGTSLIVHPYIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKDSDVYI TDKCVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPSPE (SEQ ID NO:417) V α : KQQVTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGGKLTSLLLIQSSQREQTS GRLNASLDKSAGSSTLYIAA SQPGDSATYLC AVRPTSGG SYIPTFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:418) CDR3 α : CAVRPTSGGSYIPTF (SEQ ID NO:415)	FCASSYVGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVSATF WQDPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR AD (SEQ ID NO:412) V β : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGITDQGEVPNGYNV SRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYVGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVF (SEQ ID NO:414) CDR3 β : CASSYVGNTGELFF (SEQ ID NO:416)
NY-ESO-1 (código de UniProt P78358) SLLMWITQC (SEQ ID NO:348) presentado por HLA-A*02:01:48	KQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD PGKGLTSLLLIQSSQREQTS GRLNASLDKSSGSSTLYIAA SQPGDSATYLC AVRPLLDG TYIPTFGRGTSLIVHPYIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKDSDVYI TDKCVLDMRSMDFKSNSAV AWSNKSDFACANAFNNS (SEQ ID NO:419) V α : KQEVTTQIPAALSVPEGENLV LNCSFTDSAIYNLQWFRQD	GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGTTDQGEVPNGYNV SRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYLGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLK EQPALNDSRYALSSRLRVSATF WQDPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR AD (SEQ ID NO:420) V β : GVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCA

	PGKGLTSLLLIQSSQREQTS GRLNASLDKSSGSSTLYIAA SQPGDSATYLC AVRPLLDG TYIPTFGRGTSLIVHPYIQNP (SEQ ID NO:421) CDR3 α : CAVRPLLDGTYIPTF (SEQ ID NO:423)	QDMNHEYMSWYRQDPGMGLR LIHYSVGAGTTDQGEVPNGYNV SRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVY FCASSYLGNTGELFFGEGSRLT VLEDLKNVF (SEQ ID NO:422) CDR3 β : CASSYLGNTGELFF (SEQ ID NO:424)
--	---	--

Región constante del anticuerpo y heterodimerización

[0140] La región constante del anticuerpo (dominio Fc) descrita en la presente invención puede derivar de una región constante de un anticuerpo de cualquier especie que se una a CD16. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región constante es al menos 90 % idéntica a una región constante del anticuerpo humano, tal como una región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 o una 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 del anticuerpo de otro mamífero, tal como conejo, perro, gato, ratón o caballo. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo incluye una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH1. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo que incluye una bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3 y opcionalmente un dominio CH1 se deriva de un anticuerpo de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región constante del anticuerpo incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 % a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana.

[0141] Dentro del dominio Fc, la unión a CD16 está mediada por la región de bisagra y el dominio CH2. Por ejemplo, dentro de la IgG1 humana, la interacción con CD16 se centra principalmente en los 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). Según los dominios conocidos, las mutaciones se pueden seleccionar para mejorar o reducir la afinidad de unión a CD16, como mediante el uso de bibliotecas de expresión en fagos o bibliotecas de ADNc de expresión en la superficie de levaduras, o se pueden diseñar basándose en la estructura

tridimensional conocida de la interacción.

[0142] En determinadas modalidades, las mutaciones que se pueden incorporar en el CH1 de una región constante de IgG1 humana pueden estar en el aminoácido V125, F126, P127, T135, T139, A140, F170, P171 y/o V173. En determinadas

5 modalidades, las mutaciones que se pueden incorporar en la C κ de una región constante de IgG1 humana pueden estar en el aminoácido E123, F116, S176, V163, S174 y/o T164.

[0143] El ensamblaje de las cadenas pesadas de anticuerpos heterodiméricos se puede lograr con la expresión de dos secuencias de cadenas pesadas de

10 anticuerpos diferentes en la misma célula, lo que puede conducir al ensamblaje de homodímeros de cada cadena pesada de los anticuerpos así como al ensamblaje de heterodímeros. La promoción del ensamblaje preferencial de heterodímeros se puede lograr incorporando diferentes mutaciones en el dominio CH3 de cada región constante del anticuerpo como se muestra en US13/494870, US16/028850,

15 US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 y US14/830336. Por ejemplo, pueden generarse mutaciones en el dominio CH3 basadas en IgG1 humana e incorporando pares distintos de sustituciones de aminoácidos dentro de un primer polipéptido y un segundo polipéptido que permiten que estas dos cadenas se heterodimericen

20 selectivamente entre sí. Las posiciones de las sustituciones de aminoácidos ilustradas a continuación están todas numeradas según el índice EU como en Kabat.

[0144] En un contexto, 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

25 de aminoácidos en el segundo polipéptido reemplaza el o los aminoácidos originales con un aminoácido más pequeño, seleccionado de alanina (A), serina (S), treonina (T) o valina (V), de modo que la sustitución de aminoácidos más grande (una protuberancia) encaje en la superficie de las sustituciones de aminoácidos más pequeñas (una cavidad). Por ejemplo, un polipéptido puede incorporar una

30 sustitución de T366W y el otro puede incorporar tres sustituciones que incluyen T366S, L368A e Y407V.

[0145] Se puede incorporar una o más mutaciones 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. Los ejemplos de sustituciones 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.

[0146] Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse de los siguientes conjuntos de sustituciones que se muestran en la Tabla 6.

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

15		
----	--	--

[0147] Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse de los siguientes conjuntos de sustituciones que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Conjunto 1	K409W	D399V/F405T
Conjunto 2	Y349S	E357W
Conjunto 3	K360E	Q347R
Conjunto 4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Conjunto 5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
Conjunto 6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

- 5 **[0148]** Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse del siguiente conjunto de sustituciones que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Conjunto 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Conjunto 2	T366K/L351K	L351D/Y349E
Conjunto 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Conjunto 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Conjunto 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Conjunto 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0149] Alternativamente, puede seleccionarse de la Tabla 9 al menos una sustitución de aminoácidos en cada cadena de polipéptidos.

Tabla 9	
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
--	-------

[0150] Alternativamente, al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del siguiente conjunto de sustituciones en la Tabla 10, donde la posición o posiciones indicadas en la columna de Primer polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido conocido con carga negativa, y la posición o posiciones indicadas en la columna de Segundo polipéptido se reemplaza por cualquier aminoácido conocido con carga positiva.

Tabla 10	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
K392, K370, K409 o K439	D399, E356 o E357

[0151] Alternativamente, al menos una sustitución de aminoácidos puede seleccionarse del siguiente conjunto en la Tabla 11, donde la posición o posiciones indicadas en la columna de Primer polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido conocido con carga positiva, y la posición o posiciones indicadas en la columna de Segundo polipéptido se reemplaza por cualquier aminoácido conocido con carga negativa.

Tabla 11	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
D399, E356 o E357	K409, K439, K370 o K392

[0152] Alternativamente, las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse del siguiente conjunto en la Tabla 12.

Tabla 12	
Primer polipéptido	Segundo polipéptido
T350V, L351Y, F405A e Y407V	T350V, T366L, K392L y T394W

[0153] Alternativamente, o además, la estabilidad estructural de una proteína hetero-multimérica puede incrementarse introduciendo S354C en la primera o la segunda cadena de polipéptidos, e Y349C en la cadena de polipéptidos opuesta, que forma un puente disulfuro artificial dentro de la interfaz de los dos polipéptidos.

[0154] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de

polipéptidos 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 de polipéptidos 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 e Y407.

[0155] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 e Y407, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en la posición T366.

[0156] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 de polipéptidos 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 Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 y T411.

[0157] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 y T411 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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.

[0158] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 L351, D399, S400 e Y407 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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, N390, K392, K409 y T411.

[0159] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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, N390, K392, K409 y T411 y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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 L351, D399, S400 e Y407.

[0160] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 Q347, Y349, K360 y K409, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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 Q347, E357, D399 y F405.

[0161] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 Q347, E357, D399 y F405, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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 Y349, K360, Q347 y K409.

[0162] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 K370, K392, K409 y K439, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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 D356, E357 y D399.

[0163] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de

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

[0164] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 en una o más posiciones

15 seleccionadas del grupo que consiste en L351, E356, T366 y D399, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos 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 Y349, L351, L368, K392 y K409.

20 **[0165]** En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos 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 Y349, L351, L368, K392 y K409, y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región
25 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 L351, E356, T366 y D399.

[0166] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de

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

[0167] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de

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

[0168] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con K360E y K409W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con O347R, D399V y F405T.

[0169] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con O347R, D399V y F405T y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con K360E y K409W.

[0170] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T366W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T366S, T368A e Y407V.

[0171] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T366S, T368A e Y407V y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por una sustitución con T366W.

[0172] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T350V, L351Y, F405A e Y407V y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena

de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T350V, T366L, K392L y T394W.

[0173] En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T350V, T366L, K392L y T394W y en donde la secuencia de aminoácidos de la otra cadena de polipéptidos de la región constante del anticuerpo difiere de la secuencia de aminoácidos de una región constante de IgG1 por las sustituciones con T350V, L351Y, F405A e Y407V.

[0174] A continuación se enumeran ejemplos de las mutaciones en las regiones constantes que permiten la heterodimerización de dos cadenas de polipéptidos. Las cadenas pesadas A1, A2, B1 y B2 de trastuzumab incluyen cada una un dominio variable de la cadena pesada de trastuzumab (secuencia en negrita) y una región constante derivada de IgG1 humana con mutaciones en los aminoácidos subrayados. La cadena pesada A1 de trastuzumab y la cadena pesada B1 de trastuzumab pueden emparejarse preferentemente y formar un heterodímero. La cadena pesada A2 de trastuzumab y la cadena pesada B2 de trastuzumab pueden emparejarse preferentemente y formar un heterodímero.

Cadena pesada A de trastuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO:299).

Cadena pesada B de trastuzumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK

SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 5 SPG (SEQ ID NO:300).

Cadena pesada A1 de trastuzumab

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
 GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
 WGQGT****LVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 10 ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 15 SLSPG* (SEQ ID NO:301).

Cadena pesada B1 de trastuzumab

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
 GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
 WGQGT****LVTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
 20 ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 25 SLSPG* (SEQ ID NO:302).

[0175] Las proteínas descritas anteriormente se pueden preparar con tecnología
 de ADN recombinante conocida para un experto en la técnica. Por ejemplo, una
 primera secuencia de ácido nucleico que codifica la primera cadena de la
 30 inmunoglobulina que comprende un scFv, una bisagra y una región constante del
 anticuerpo puede clonarse en un primer vector de expresión; una segunda
 secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda cadena de la inmunoglobulina,
 por ejemplo, que comprende otro scFv, una bisagra y una región constante del
 anticuerpo o que comprende una cadena pesada del anticuerpo se puede clonar en

un segundo vector de expresión; y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo puede clonarse en un tercer vector de expresión. El primer, el segundo y opcionalmente el tercer vector de expresión se pueden transfectar de forma estable en células hospedadoras para producir las

5 proteínas multiméricas descritas en la presente.

[0176] Para lograr el mayor rendimiento de la proteína de unión multiespecífica, se pueden explorar diferentes cocientes del primer, el segundo y el tercer vector de expresión para determinar el cociente óptimo para la transfección en las células hospedadoras. Después de la transfección, se pueden aislar clones individuales

10 para la generación de bancos de células usando métodos conocidos en la técnica, tales como dilución limitada, ELISA, FACS, microscopía o Clonepix.

[0177] Los clones se pueden cultivar en condiciones adecuadas para el aumento a escala del biorreactor y la expresión sostenida de la proteína de unión multiespecífica. Las proteínas de unión multiespecíficas pueden aislarse y purificarse

15 con métodos conocidos en la técnica que incluyen centrifugación, filtración profunda, lisis celular, homogeneización, congelación y descongelación, purificación por afinidad, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio de interacción hidrófoba y cromatografía de modo mixto.

II. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

[0178] En la invención se proporcionan métodos para tratar el cáncer con una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente. Los métodos pueden usarse para tratar una diversidad de cánceres, incluso un tumor sólido, un linfoma y una leucemia. Es deseable que el tipo de cáncer que se va a tratar corresponda al tipo de célula

20 cancerosa a la que se une la proteína. Por ejemplo, el tratamiento de un cáncer que expresa HER2, tal como un cáncer de mama que expresa HER2, se trata de forma deseable con una proteína descrita en la presente que se une a la proteína. En determinadas modalidades, la invención proporciona métodos para tratar una diversidad de cánceres que expresan BCMA mediante la administración a un

25 paciente que lo necesite de una cantidad con eficacia terapéutica de una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente. En determinadas modalidades, la invención proporciona métodos para tratar una diversidad de cánceres que expresan CD33 mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad con

30 eficacia terapéutica de una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente.

[0179] Por consiguiente, en un aspecto de la invención se proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente, en donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad con eficacia terapéutica de una proteína descrita en la presente para tratar el cáncer. A continuación se describen aspectos y modalidades adicionales de los métodos terapéuticos.

[0180] El método terapéutico se puede caracterizar según el cáncer a tratar. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el cáncer es un tumor sólido. En ciertas otras modalidades, el cáncer es cáncer encefálico, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, leucemia, carcinoma broncopulmonar, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de estómago, cáncer de testículo o cáncer de útero. En otras modalidades, el cáncer es un tumor vascularizado, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma microcítico, melanoma, neuroblastoma, sarcoma (*por ejemplo*, un angiosarcoma o condrosarcoma), cáncer de laringe, cáncer de parótida, cáncer de las vías biliares, cáncer de tiroides, melanoma lentiginoso acro, queratosis actínica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma cístico adenoide, adenomas, adenosarcoma, carcinoma adenoescamoso, cáncer del conducto anal, cáncer de ano, cáncer de ano y recto, tumor astrocítico, carcinoma de la glándula de Bartolino, carcinoma basocelular, cáncer biliar, cáncer óseo, cáncer de médula ósea, cáncer de bronquios, carcinoma de las glándulas bronquiales, carcinoide, colangiocarcinoma, condrosarcoma, papiloma/carcinoma de plexos coroideos, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, carcinoma de células claras, cáncer del tejido conjuntivo, cistadenoma, cáncer del aparato digestivo, cáncer de duodeno, cáncer del sistema endocrino, tumor del seno endodérmico, hiperplasia de endometrio, sarcoma estromal de endometrio, adenocarcinoma endometriode, cáncer de células endoteliales, cáncer de epéndimo, cáncer de células epiteliales, sarcoma de Ewing, cáncer ocular y orbitario, cáncer de genitales femeninos, hiperplasia nodular focal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de antro pilórico, cáncer de fondo gástrico, gastrinoma, glioblastoma, glucagonoma, cáncer de corazón, hemangioblastomas, hemangioendotelioma, hemangiomas, adenoma hepático, adenomatosis hepática, cáncer hepatobiliar, carcinoma hepatocelular, enfermedad de Hodgkin, cáncer de íleon, insulinoma, neoplasia intraepitelial, neoplasia interepitelial de células

escamosas, cáncer intrahepáticos de las vías biliares, carcinoma invasivo de células escamosas, cáncer de yeyuno, cáncer de articulaciones, sarcoma de Kaposi, cáncer de pelvis, carcinoma de células grandes, cáncer de intestino grueso, liomiosarcoma, melanoma sobre lentigo maligno, linfoma, cáncer de genitales masculinos,

5 melanoma maligno, tumores mesoteliales malignos, meduloblastoma, meduloepitelioma, cáncer de meninges, cáncer mesotelial, carcinoma metastásico, cáncer bucal, carcinoma mucoepidermoide, mieloma múltiple, cáncer de los músculos, cáncer de las vías nasales, cáncer del sistema nervioso, adenocarcinoma neuroepitelial, melanoma nodular, cáncer de piel no epitelial, carcinoma de células

10 pequeñas, cáncer oligodendroglioma, cáncer de la cavidad bucal, osteosarcoma, adenocarcinoma seroso papilar, cáncer de pene, cáncer de faringe, tumores hipofisarios, plasmacitoma, pseudosarcoma, blastoma pulmonar, cáncer de recto, cáncer de células renales, cáncer del aparato respiratorio, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, sarcoma, carcinoma seroso, cáncer de senos paranasales,

15 cáncer de piel, carcinoma microcítico, cáncer de intestino delgado, cáncer de músculo liso, cáncer de tejidos blandos, tumor con secreción de somatostatina, cáncer de columna vertebral, carcinoma de células escamosas, cáncer de músculo estriado, cáncer submesotelial, melanoma con diseminación superficial, leucemia de linfocitos T, cáncer de lengua, carcinoma no diferenciado, cáncer de uréter, cáncer

20 de uretra, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del aparato urinario, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, melanoma maligno uveal, cáncer de vagina, carcinoma verrugoso, vipoma, cáncer de vulva, carcinoma diferenciado o tumor de Wilms.

[0181] En otras determinadas modalidades, el cáncer que se va a tratar es un

25 linfoma no hodgkiniano, tal como un linfoma de linfocitos B o un linfoma de linfocitos T. En determinadas modalidades, el linfoma no hodgkiniano es un linfoma de linfocitos B, tal como un linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma mediastínico primario de linfocitos B, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B de zona marginal, linfoma de linfocitos B de

30 zona marginal extraganglionar, linfoma de linfocitos B de zona marginal ganglionar, linfoma esplénico de linfocitos B de zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico, leucemia de células pilosas o linfoma primario del sistema nervioso central (SNC). En ciertas otras modalidades, el linfoma no hodgkiniano es un linfoma de linfocitos T, tal como un linfoma linfoblástico de precursores T, linfoma periférico

de linfocitos T, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma extraganglionar de linfocitos citolíticos naturales/linfocitos T, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, linfoma de linfocitos T subcutáneo similar a paniculitis, linfoma anaplásico de células grandes o linfoma periférico de linfocitos T.

[0182] En determinadas modalidades, los cánceres son LMA, síndromes mielodisplásicos, leucemia mielomonocítica crónica, crisis blástica mieloide de leucemia mieloide crónica y LLA.

[0183] En determinadas modalidades, el cáncer a tratar se puede caracterizar según la presencia de un antígeno en particular que se exprese en la superficie de la célula cancerosa. En determinadas modalidades, la célula cancerosa puede expresar, además de BCMA, uno o más de los siguientes: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 y PD1.

[0184] En determinadas modalidades, la célula cancerosa puede expresar, además de CD33, uno o más de los siguientes: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, TROP2, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 y PD1.

[0185] En determinadas modalidades, la célula cancerosa puede expresar, además de HER2, uno o más de los siguientes: CD2, CD19, CD20, CD30, CD38, CD40, CD52, CD70, EGFR/ERBB1, IGF1R, HER3/ERBB3, HER4/ERBB4, MUC1, cMET, SLAMF7, PSCA, MICA, MICB, TRAILR1, TRAILR2, MAGE-A3, B7.1, B7.2, CTLA4 y PD1.

[0186] En determinadas modalidades, el cáncer que se va a tratar se puede caracterizar según la presentación de un péptido del TAA en particular mediante un MHC en la superficie de la célula cancerosa. Los ejemplos no taxativos de proteínas que pueden procesarse en péptidos del TAA dirigidos a TCR incluyen antígenos de diferenciación de tejidos (*por ejemplo*, MART-1, gp100, CEA, CD19 y tirosinasa), antígenos de la estirpe germinal tumoral (*por ejemplo*, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A12, MAGE-C2, BAGE1, GAGE1, CTAG1, CTAG2, XAGE-1B y SSX2), proteínas normales sobreexpresadas por células cancerosas (*por ejemplo*, hTERT, EGFR, ERBB2, WT1, MUC1 y mesotelina), proteínas virales

(por ejemplo, HPV, EBV y MCC) y antígenos mutados específicos de tumores. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido ELAVL4 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:425 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido de insulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:426 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido hTERT que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:340 presentada por HLA-A*02:01:48. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido ERBB2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:341 presentada por HLA-A*02. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido WT1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:342 presentada por HLA-A*02. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido MAGE-A3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:343 presentada por HLA-A1. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido MART1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 344 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido BIRC5 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:346 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido PRAME que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 347 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido NY-ESO-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 348 presentada por HLA-A2. En determinadas modalidades, la célula cancerosa contiene un péptido SSX2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:345 presentada por HLA-A2.

III. POLITERAPIA

[0187] En otro aspecto de la invención se proporciona una politerapia. Se puede usar una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente combinada con otras sustancias terapéuticas para tratar el cáncer.

[0188] Las sustancias terapéuticas de ejemplo que se pueden usar como parte de una politerapia en el tratamiento del cáncer incluyen, por ejemplo, radiación, mitomicina, tretinoína, ribomustina, gemcitabina, vincristina, etopósido, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorubicina, carbocina, pentostatina, nitracrina, zinostatina, cetorelix, letrozol, raltitrexed, daunorubicina, fadrozol, fotemustina, timalfasina, sobuzoxano, nedaplatino, citarabina, bicalutamida, vinorelbina,

vesnarinona, aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptinio, quetanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vindesina, flutamida, drogenil, butocina, carmofur, razoxano, sizofilan, carboplatino, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanil, levamisol, tenipósido, improsulfán, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona, mepitiostano, epitioestanol, formestano, interferón alfa, interferón 2 alfa, interferón beta, interferón gamma, factor estimulador de colonias 1, factor estimulador de colonias 2, denileucina diftotox, interleucina 2, factor de liberación de la hormona luteinizante y variaciones de las sustancias antemencionadas que pueden presentar una unión diferencial a su receptor análogo y un aumento o una disminución de la semivida en suero.

[0189] Otra clase de sustancias que pueden usarse como parte de una politerapia para tratar el cáncer son los inhibidores de los puntos de control inmunitario. Los inhibidores de los puntos de control inmunitario de ejemplo incluyen sustancias que inhiben uno o más de (i) el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4), (ii) la proteína 1 de muerte celular programada (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 y (vii) TIM3. El ipilimumab, inhibidor de CTLA4, fue aprobado por la Food and Drug Administration [Administración de Alimentos y Fármacos] de Estados Unidos para el tratamiento del melanoma.

[0190] Otras sustancias que pueden usarse como parte de una politerapia en el tratamiento del cáncer son sustancias con anticuerpos monoclonales que se dirijan a dianas que no sean puntos de control (*por ejemplo*, Herceptin) y sustancias que no sean citotóxicas (*por ejemplo*, inhibidores de la tirosina cinasa).

[0191] Otras categorías de sustancias 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 tirosina cinasa Bcr-Abl, un inhibidor de Bruton de la tirosina cinasa, un inhibidor de CDC7, un inhibidor de CHK1, un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, un inhibidor de DNA-PK, un inhibidor de DNA-PK y de mTOR, un inhibidor de DNMT1, un inhibidor de DNMT1 más 2-cloro-desoxiadenosina, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de la vía de transducción de señales 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 fosfoinositido 3-cinasa, un inhibidor de PARP1 y DHODH, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de la

topoisomerasa II, un inhibidor de la tirosina cinasa, 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 que se selecciona de IL-12, IL-15, GM-CSF y G-CSF.

5 **[0192]** Las proteínas de la invención también se pueden usar como complemento de la extirpación quirúrgica de la lesión elemental.

[0193] La cantidad de proteína de unión multiespecífica y de la sustancia terapéutica adicional así como el momento relativo de administración pueden seleccionarse de modo que se logre un efecto terapéutico combinado deseado. Por
10 ejemplo, cuando se administra una politerapia a un paciente que necesita tal administración, las sustancias terapéuticas en la combinación, o una composición o composiciones farmacéuticas que comprenden las sustancias terapéuticas, se pueden administrar en cualquier orden, por ejemplo, en secuencia, coincidiendo, juntos, de forma simultánea y similares. Además, por ejemplo, se puede administrar
15 una proteína de unión multiespecífica durante un tiempo en el que la o las sustancias terapéuticas adicionales tienen efecto profiláctico o terapéutico, o *viceversa*.

IV. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0194] La presente descripción también presenta composiciones/formulaciones
20 farmacéuticas que contienen una cantidad con eficacia terapéutica de una proteína de unión multiespecífica que se describe en la presente.

[0195] La composición se puede formular para su uso en una diversidad de sistemas para la administración de fármacos. También se pueden incluir en la composición uno o más excipientes o vehículos aceptables desde el punto de vista
25 fisiológico para una formulación adecuada. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente descripción se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pensilvania, 17° ed., 1985. Para obtener una reseña de los métodos para la administración de fármacos, véase, *por ejemplo*, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

30 **[0196]** La formulación para administración de fármacos por vía intravenosa de la presente descripción puede contenerse 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 ciertas modalidades, la

formulación puede liofilizarse y estar contenida en aproximadamente 12-60 frascos. En determinadas modalidades, la formulación se puede liofilizar y se pueden contener 45 mg de la formulación liofilizada en un frasco. En ciertas modalidades, los aproximadamente 40 mg - aproximadamente 100 mg de la formulación liofilizada pueden estar contenidos en un frasco. En determinadas modalidades, la formulación liofilizada de 12, 27 o 45 frascos se combina para obtener una dosis terapéutica de la proteína en la formulación de fármaco para administrar por vía intravenosa. En ciertas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse de aproximadamente 250 mg/frasco a aproximadamente 1000 mg/frasco. En ciertas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como aproximadamente 600 mg/frasco. En ciertas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como aproximadamente 250 mg/frasco.

[0197] Las proteínas de la presente descripción pueden existir en una formulación farmacéutica acuosa líquida que incluye una cantidad con eficacia terapéutica de la proteína en una solución amortiguada que forme una formulación.

[0198] Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal como se encuentren, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones será normalmente de entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y lo más preferentemente entre 7 y 8, tal como de 7 a 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida se pueden envasar en varias unidades de una dosis única, cada una de las cuales contiene una cantidad fija de la sustancia o sustancias mencionadas anteriormente. La composición en forma sólida también se puede envasar en un recipiente para una cantidad variable.

[0199] En determinadas modalidades, en la presente descripción se proporciona una formulación con una vida útil prolongada que incluye la proteína de la presente descripción, combinada con manitol, monohidrato de ácido cítrico, citrato de sodio, dihidrato de fosfato disódico, dihidrogenofosfato de sodio dihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, agua e hidróxido de sodio.

[0200] En determinadas modalidades, se prepara una formulación acuosa que incluye la proteína de la presente descripción en una solución amortiguada con pH. El amortiguador de esta invención puede tener un pH en el intervalo de

aproximadamente 4 a aproximadamente 8, *por ejemplo*, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, o de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5, o puede tener un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2. También se pretende que los intervalos intermedios de los pH mencionados anteriormente formen parte de esta descripción. Por ejemplo, se pretende que se incluyan intervalos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superior y/o inferior. Los ejemplos de amortiguadores que controlarán el pH dentro de este intervalo incluyen acetato (*por ejemplo*, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros amortiguadores de ácidos orgánicos.

[0201] En ciertas modalidades, la formulación incluye un sistema de amortiguación que contiene citrato y fosfato para mantener el pH en un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. En ciertas modalidades, el intervalo del pH puede ser de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, o de aproximadamente pH 4,8 a aproximadamente 5,5, o en un intervalo del pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2. En determinadas modalidades, el sistema de amortiguación incluye monohidrato de ácido cítrico, citrato de sodio, dihidrato de fosfato disódico y/o dihidrogenofosfato de sodio dihidrato. En determinadas modalidades, el sistema de amortiguación incluye aproximadamente 1,3 mg/ml de ácido cítrico (*por ejemplo*, 1,305 mg/ml), aproximadamente 0,3 mg/ml de citrato de sodio (*por ejemplo*, 0,305 mg/ml), aproximadamente 1,5 mg/ml de dihidrato de fosfato disódico (*por ejemplo*, 1,53 mg/ml), aproximadamente 0,9 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidrato (*por ejemplo*, 0,86) y aproximadamente 6,2 mg/ml de cloruro de sodio (*por ejemplo*, 6,165 mg/ml). En determinadas modalidades, el sistema de amortiguación 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 dihidrato de fosfato disódico, 0,7 a 1,1 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidrato y 6,0 a 6,4 mg/ml de cloruro de sodio. En ciertas modalidades, el pH de la formulación se ajusta con hidróxido de sodio.

[0202] También se puede incluir en la formulación un poliol, que actúa como tonificante y puede estabilizar el anticuerpo. El poliol se añade a la formulación en una cantidad que puede variar según la isotonicidad deseada para la formulación. En determinadas modalidades, la formulación acuosa puede ser isotónica. La cantidad de poliol que se agrega también puede modificarse según el peso

molecular del poliol. Por ejemplo, se puede añadir una cantidad menor de un monosacárido (*por ejemplo*, manitol), en comparación con un disacárido (como trehalosa). En determinadas modalidades, el poliol que se puede utilizar en la formulación como elemento de tonicidad es manitol. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de aproximadamente 7,5 a 15 mg/ml. En ciertas modalidades, la concentración de manitol puede ser de aproximadamente 10-14 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de aproximadamente 12 mg/ml. En determinadas modalidades, el poliol sorbitol se puede incluir en la formulación.

[0203] También se puede añadir un detergente o tensioactivo a la formulación. Los detergentes de ejemplo incluyen detergentes no iónicos tales como polisorbatos (*por ejemplo*, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (*por ejemplo*, poloxámero 188). La cantidad de detergente que se agrega es tal que reduce la acumulación 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 que se utiliza para describir el monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (véase Fiedler, Lexikon der Hfisstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4° ed., 1996). En determinadas modalidades, la formulación puede contener entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, o entre aproximadamente 0,5 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml. En determinadas modalidades, se puede añadir a la formulación aproximadamente un 0,1 % de polisorbato 80.

[0204] En modalidades, el producto proteico de la presente descripción se formula como una formulación líquida. La formulación líquida puede presentarse en una concentración de 10 mg/ml en un frasco que cumpla con las condiciones de las farmacopeas europea y de Estados Unidos de tipo I 50R que se cierra con un tapón de goma y se sella con una tapa de aluminio. El tapón puede estar hecho de un elastómero que cumpla con las farmacopeas europea y de Estados Unidos. En determinadas modalidades, los frascos se pueden llenar con 61,2 ml de la solución del producto proteico para permitir un volumen extraíble de 60 ml. En determinadas modalidades, la formulación líquida se puede diluir con solución salina al 0,9 %.

[0205] En determinadas modalidades, la formulación líquida de las proteínas de la

descripción se puede preparar como una solución con una concentración de 10 mg/ml combinada con un azúcar a un nivel que genere estabilidad. En determinadas modalidades, la formulación líquida se puede preparar en un vehículo acuoso. En determinadas modalidades, se puede añadir un estabilizador en una cantidad que no supere aquella que pueda producir una viscosidad indeseable o inadecuada para la administración intravenosa. En determinadas modalidades, el azúcar puede ser un disacárido, *por ejemplo*, sacarosa. En determinadas modalidades, la formulación líquida también puede incluir uno o más de un amortiguador, un tensioactivo y un conservante.

10 **[0206]** En determinadas modalidades, el pH de la formulación líquida puede establecerse mediante la adición de un ácido y/o una base farmacéuticamente aceptable. En determinadas modalidades, el ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico. En determinadas modalidades, la base puede ser hidróxido de sodio.

15 **[0207]** Además de la acumulación, la desamidación es una variante de producto común en los péptidos y las proteínas que puede ocurrir durante la fermentación, la obtención/clarificación de células, la purificación, el almacenamiento de sustancias farmacéuticas/medicamentos y durante el análisis de las muestras. La desamidación es la pérdida de NH_3 de una proteína que forma un intermediario de succinimida que puede sufrir hidrólisis. El intermediario de succinimida produce una disminución de masa de 17 dalton del péptido original. La hidrólisis posterior produce un aumento de masa de 18 dalton. El aislamiento del intermediario de succinimida es difícil debido a la inestabilidad en condiciones acuosas. Por tanto, la desamidación se detecta normalmente como un aumento de masa de 1 dalton. La desamidación de una asparagina produce ácido aspártico o isoaspártico. Los parámetros que afectan la velocidad de desamidación incluyen el pH, la temperatura, la constante dieléctrica del solvente, la fuerza iónica, la secuencia principal, la conformación local de polipéptidos y la estructura terciaria. Los residuos de aminoácidos contiguos a Asn en la cadena de péptidos afectan las tasas de desamidación. Gly y Ser que se encuentran tras una Asn en secuencias de proteínas producen una mayor susceptibilidad a la desamidación.

[0208] En determinadas modalidades, la formulación líquida de las proteínas de la presente descripción puede conservarse en condiciones de pH y humedad para evitar la desaminación del producto proteico.

[0209] El vehículo acuoso de interés en la presente es aquel que sea farmacéuticamente aceptable (inocuo y que no resulte tóxico cuando se administre a seres humanos) y que sea útil para la preparación de una formulación líquida. Los vehículos ilustrativos incluyen agua estéril para inyección (SWFI, por su sigla en inglés), agua bacteriostática para inyección (BWFI, por su sigla en inglés), una solución salina amortiguada con pH (*por ejemplo*, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0210] Puede añadirse 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 uso múltiple (administración múltiple).

[0211] Las formulaciones intravenosas (IV) pueden ser la vía de administración preferida en casos particulares, como cuando un paciente está en el hospital después de un trasplante y recibe todos los medicamentos por 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 medicamento diluido para inyección es isotónico y es adecuado para la administración mediante infusión intravenosa.

[0212] En determinadas modalidades, se pueden añadir componentes de sales o amortiguadores en una cantidad de 10 mM - 200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y derivan de varios ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser un amortiguador con fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguadores de glicinato, carbonato y citrato, en cuyo caso, los iones de sodio, potasio o amonio pueden servir como contraión.

[0213] Puede añadirse 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 uso múltiple (administración múltiple).

[0214] El vehículo acuoso de interés en la presente es aquel que sea farmacéuticamente aceptable (inocuo y que no sea tóxico cuando se administre a seres humanos) y que sea útil para la preparación de una formulación líquida. Los vehículos ilustrativos incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua

bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguada con pH (*por ejemplo*, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0215] Las proteínas de la presente descripción pueden existir en una formulación liofilizada que incluye las proteínas y un lioprotector. El lioprotector puede ser un glúcido, *por ejemplo*, disacáridos. En ciertas modalidades, el lioprotector puede ser sacarosa o maltosa. La formulación liofilizada también puede incluir uno o más de un amortiguador, un tensioactivo, un espesante y/o un conservante.

[0216] La cantidad de sacarosa o maltosa que resulta útil para estabilizar el medicamento liofilizado puede estar en un cociente en peso de al menos 1:2 de proteína respecto a sacarosa o maltosa. En determinadas modalidades, el cociente en peso de la proteína respecto a la sacarosa o maltosa puede ser de 1:2 a 1:5.

[0217] En determinadas modalidades, el pH de la formulación, antes de la liofilización, puede establecerse mediante la adición de un ácido y/o una base farmacéuticamente aceptables. En determinadas modalidades, el ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico. En ciertas modalidades, la base farmacéuticamente aceptable puede ser hidróxido de sodio.

[0218] Antes de la liofilización, el pH de la solución que contiene la proteína de la presente descripción puede ajustarse entre 6 y 8. En determinadas modalidades, el intervalo de pH para el producto farmacéutico liofilizado puede ser de 7 a 8.

[0219] En determinadas modalidades, se pueden añadir componentes de sales o amortiguadores en una cantidad de 10 mM - 200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y derivan de varios ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser un amortiguador con fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguadores de glicinato, carbonato y citrato, en cuyo caso, los iones de sodio, potasio o amonio pueden servir como contraión.

[0220] En determinadas modalidades, se puede añadir un "espesante". Un "espesante" es un compuesto que agrega masa a una mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física del polvo liofilizado para suspensión (*por ejemplo*, facilita la producción de un polvo liofilizado para suspensión esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poros abiertos). Los espesantes ilustrativos incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol. Las formulaciones liofilizadas de la

presente invención pueden contener tales espesantes.

[0221] Puede añadirse 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 uso múltiple (administración múltiple).

[0222] En ciertas modalidades, el medicamento liofilizado puede estar constituido por un vehículo acuoso. El vehículo acuoso de interés en la presente es aquel que sea farmacéuticamente aceptable (*por ejemplo*, inocuo y que no sea tóxico cuando se administre a seres humanos) y que sea útil para la preparación de una formulación líquida, luego de la liofilización. Los vehículos ilustrativos incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguada con pH (*por ejemplo*, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0223] En determinadas modalidades, el medicamento liofilizado de la presente descripción se reconstituye con agua estéril para inyección, según la farmacopea de Estados Unidos (SWFI) o cloruro de sodio para inyección al 0,9 %, según la farmacopea de Estados Unidos. Durante la reconstitución, el polvo liofilizado se disuelve en una solución.

[0224] En ciertas modalidades, el producto proteico liofilizado de la presente descripción se constituye en aproximadamente 4,5 ml de agua para inyección y se diluye con solución salina al 0,9 % (solución de cloruro de sodio).

[0225] El nivel de administración real de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención puede variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxico para el paciente.

[0226] La dosis específica puede ser una dosis uniforme para cada paciente, por ejemplo, 50-5000 mg de proteína. Alternativamente, la dosis de un paciente se puede adaptar al peso corporal aproximado o a la superficie del paciente. Otros factores para determinar la dosis adecuada pueden incluir la enfermedad o afección a tratar o prevenir, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y la edad, el sexo y el estado clínico del paciente. Los expertos en la técnica realizan de forma habitual un refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis adecuada para el tratamiento, especialmente en vista de la información de la

administración y los análisis descritos en la presente. La dosis también se puede determinar mediante el uso de análisis conocidos para determinar la dosis utilizada junto con los datos pertinentes de dosis y respuesta. La dosis de un paciente individual se puede ajustar a medida que se monitorea la evolución de la enfermedad. Se puede medir la concentración en sangre de la construcción o complejo que puede servir de diana en un paciente para evaluar si es necesario ajustar la dosis para alcanzar o mantener una concentración que resulte eficaz. Se puede utilizar la farmacogenómica para determinar qué construcciones y/o complejos que pueden servir de diana, y qué dosis de estos, tienen mayor probabilidad de ser eficaces en un individuo determinado (Schmitz *et ál.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer *et ál.*, *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).

[0227] En general, las dosis en función del peso corporal son de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, tal como aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal,

- aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal,
aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal,
aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal,
aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal,
5 aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 10 µg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal,
aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal,
10 aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 50 µg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 50 µg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal,
15 aproximadamente 100 µg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal,
aproximadamente 100 µg a about 50 mg/kg de peso corporal, about 100 µg a
aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 µg a
aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a
aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a
20 aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg a
aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg a
aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 10 mg a
aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg a
aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal.
- 25 **[0228]** Las dosis se pueden administrar una o más veces al día, semanalmente,
mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en
la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición de la dosis en función
del tiempo de permanencia y las concentraciones que se hayan medido de la
construcción o el complejo que pueden servir de diana en los líquidos o tejidos
30 corporales. La administración de la presente invención puede ser por vía
intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural,
intratecal, intracavitaria, por perfusión a través de un catéter o por inyección
intralesional directa. Esta se puede administrar una o más veces al día, una o más
veces a la semana, una o más veces al mes y una o más veces al año.

[0229] En la descripción anterior se describen varios aspectos y modalidades de la invención. La solicitud de patente contempla específicamente todas las combinaciones y permutaciones de los aspectos y las modalidades.

EJEMPLOS

- 5 [0230] La invención que se describió hasta ahora de forma general se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente a efectos de ilustrar ciertos aspectos y modalidades de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1 - Purificación de F3-TriNKET y F3'-TriNKET

- 10 [0231] Las proteínas F3-TriNKET y F3'-TriNKET se purificaron siguiendo las etapas que se utilizan para purificar los anticuerpos monoclonales terapéuticos. En resumen, el método de purificación incluyó una purificación de proteína A (que alcanzó aproximadamente un 80-90 % del monómero) seguida de una elución de la etapa de sal con Poros HS CIEX (que alcanzó aproximadamente un 97-99 % del
- 15 monómero). Para el proceso de fabricación clínica, se puede agregar una etapa de purificación adicional con Q Cepharose o Q Mustang (modo de flujo continuo) (para alcanzar aproximadamente un 99 % del monómero) para reducir aún más la proteína de célula completa (WCP, por su sigla en inglés) y el ADN de CHO.

- [0232] El F3'-TriNKET purificado tiene una estabilidad térmica elevada (DSC),
- 20 similar a los anticuerpos monoclonales terapéuticos. Y la estabilidad del Fc mutante que contiene F3'-TriNKET es cercana a la de Fc de IgG1. Véase la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13

Molécula	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)	T _{m3} (°C)
Herceptin	72,4	83,6	
F3'-TriNKET	73,2	79,0	86,7

- 25 **Ejemplo 2 - F3'-TriNKET es estable durante al menos 4 semanas**

[0233] En un estudio de estabilidad acelerada que se llevó a cabo a 37 °C, se encontró que F3'-TriNKET se mantuvo estable durante 4 semanas. Véanse las FIG. 3A-3C.

[0234] El F3'-TriNKET purificado fue estable durante el mantenimiento a pH bajo.

Se incubaron 20 mg/ml de la proteína purificada durante 2 horas en glicina a pH 3,0. En la FIG. 4 se muestra que el F3'-TriNKET purificado fue estable durante el mantenimiento a pH bajo.

[0235] El F3'-TriNKET purificado fue estable después de 5 ciclos de congelación y descongelación. En la FIG. 5A y la FIG. 5B se muestra que el F3'-TriNKET purificado fue estable después de 5 ciclos de congelación y descongelación, independientemente del pH (en la FIG. 5A se muestran los ciclos de congelación y descongelación en PBS y en la FIG. 5B se muestran los ciclos de congelación y descongelación en citrato a pH 5,5).

[0236] El F3'-TriNKET purificado fue estable en estudios de degradación forzada. En la FIG. 6 se muestran gráficos de barras de las condiciones de degradación forzada en las que F3'-TriNKET permaneció estable.

Ejemplo 3 - Evaluación de la unión de TriNKET a antígenos de cáncer humanos expresados en las células

[0237] Se usaron estirpes de células cancerosas humanas que expresaban un antígeno del cáncer de interés para evaluar la unión del antígeno tumoral de TriNKET. Se utilizó la estirpe celular de LMA humana Molm-13 para evaluar la unión de F3'-TriNKET-CD33 a las células que expresaban CD33. La estirpe celular Colo-201 HER2+ se utilizó para evaluar la unión de F3'-TriNKET-HER2 a células que expresaban HER2. Se diluyeron F3'-TriNKET-HER2 y F3'-TriNKET-CD33 y se incubaron con las células respectivas. La unión de F3'-TriNKET-HER2 y F3'-TriNKET-CD33 a las células que expresaban HER2 y que expresaban CD33, respectivamente, se detectó utilizando un anticuerpo secundario contra la IgG humana conjugado con fluoróforo. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, la unión de MFI a células que expresaban HER2 y CD33, respectivamente, se normalizó a testigos con anticuerpos secundarios para obtener los valores del múltiplo respecto al antecedente.

Ejemplo 4 - Análisis principal sobre la citotoxicidad de los linfocitos NK humanos

[0238] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) de capas leucoplaquetarias de sangre periférica humana con centrifugación en gradiente de densidad. Las PBMC aisladas se lavaron y se prepararon para aislar linfocitos NK. Los linfocitos NK se aislaron con una técnica de selección negativa con perlas magnéticas, la pureza de los linfocitos NK aislados fue

normalmente > 90 % de CD3-CD56+. Se dejaron en reposo durante la noche los linfocitos NK aislados y se utilizaron al día siguiente en el análisis sobre la citotoxicidad.

Análisis sobre citotoxicidad DELFIA:

- 5 **[0239]** Las estirpes celulares humanas de cáncer que expresaban una diana de interés se recogieron del cultivo, se lavaron las células con PBS y se volvieron a suspender en un medio de cultivo a 10^6 /ml para marcarlas con el reactivo BATDA (Perkin Elmer AD0116). Se siguieron las instrucciones del fabricante para marcar las células seleccionadas como diana. Después de marcarlas, se lavaron 3 veces
- 10 las células con PBS y se volvieron a suspender a $0,5-1,0 \times 10^5$ /ml en un medio de cultivo. Para preparar los pocillos de fondo, se apartó una parte de las células marcadas y se centrifugaron las células del medio. Se añadieron cuidadosamente 100 μ l del medio a los pocillos por triplicado para no alterar las células sedimentadas. Se añadieron 100 μ l de células marcadas con BATDA a cada pocillo
- 15 de la placa de 96 pocillos. Se reservaron pocillos para la liberación espontánea de las células seleccionadas como diana y se prepararon pocillos para la lisis máxima de las células seleccionadas como diana mediante la adición de Triton-X al 1 %. Los anticuerpos monoclonales o TriNKET contra el tumor seleccionado como diana de interés se diluyeron en medio de cultivo, se añadieron 50 μ l de mAb diluido o
- 20 TriNKET a cada pocillo. Se recogieron del cultivo linfocitos NK en reposo y/o activados, se lavaron las células y se volvieron a suspender a $10^5-2,0 \times 10^6$ /ml en medios de cultivo en función del cociente E:T deseado. Se añadieron 50 μ l de linfocitos NK a cada pocillo de la placa para tener un volumen de cultivo total de 200 μ l. La placa se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2-3 horas antes de seguir
- 25 con el análisis.

- [0240]** Después de cultivar durante 2-3 horas, se retiró la placa de la incubadora y se sedimentaron las células mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos. Se transfirieron 20 μ l de sobrenadante de cultivo a una microplaca limpia proporcionada por el fabricante y se añadieron 200 μ l de solución de europio a temperatura
- 30 ambiente a cada pocillo. Se protegió la placa de la luz y se incubó en un agitador de placas a 250 rpm durante 15 minutos. Se leyó la placa con los instrumentos Victor 3 o SpectraMax i3X. Se calculó el % de lisis específica como se muestra a continuación: % de lisis específica = ((liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea)) * 100 %.

Análisis sobre la citotoxicidad con citometría de flujo

[0241] Se recogieron del cultivo las estirpes celulares humanas de cáncer que expresaban BCMA y que se transdujeron para que expresaran NucLight Green (Essen BioScience 4475) de forma estable luego de la selección con puromicina, se centrifugaron y se volvieron a suspender a 10^5 /ml en un medio de cultivo. Se agregaron 100 μ l de células seleccionadas como diana a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se diluyeron TriNKET en oposición a BCMA en medios de cultivo y se añadieron 50 μ l de cada uno a pocillos por duplicado. Se recogieron del cultivo los linfocitos NK que estuvieron en reposo durante la noche, se lavaron y se volvieron a suspender a 4×10^5 /ml en medio de cultivo. Para un cociente de E:T de 2:1, se añadieron 50 μ l de linfocitos NK a todos los pocillos excepto en los testigos que solo contenían la diana, que recibieron 100 μ l de medio de cultivo. La placa se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 30 horas.

[0242] Después del cultivo conjunto, se tiñeron las células, se fijaron y se analizaron con citometría de flujo. Las células seleccionadas como diana restantes se detectaron con fuertes cambios en el canal FITC, y se excluyeron las células muertas con tinción para determinar la viabilidad. Se exportó el número de eventos verdes y se calculó el % de destrucción en comparación con las muestras de referencia que solo contenían las dianas. Se incluyeron perlas de recuento para asegurarse de que los volúmenes registrados fueran comparables.

Ejemplo 5 - Los F3' TriNKET se unen a los antígenos tumorales expresados en las células

[0243] En la FIG. 7 se muestra la unión de F3'-TriNKET-HER2 o trastuzumab a células Colo-201 HER2+. F3'-TriNKET-HER2 se unió a las células Colo-201 a un múltiplo respecto al antecedente máximo más elevado, pero tuvo un valor de unión CE₅₀ un poco menor.

[0244] En la FIG. 8 se muestra la unión del anticuerpo monoclonal CD33 o F3'-TriNKET-CD33 a CD33 que se expresa en las células Molm-13. F3'-TriNKET se unió a las células Molm-13 con un múltiplo respecto al antecedente máximo similar y el valor de unión de la CE₅₀ fue similar al del mAb CD33.

Ejemplo 6 - Los F3'-TriNKET median la citotoxicidad de los NK contra las células seleccionadas como diana HER2+ y CD33+:

[0245] En la FIG. 9 y la FIG. 10 se muestra la citotoxicidad mediada por F3'-TriNKET-HER2 contra la estirpe celular 786-O con poca expresión de HER2 y la

estirpe celular SkBr-3 con expresión elevada de HER2, respectivamente. El F3'-TriNKET-HER2 proporcionó potentes valores de CE_{50} para la inducción de la citotoxicidad de los NK contra ambas estirpes celulares con expresión elevada de HER2 y con poca expresión de HER2. En comparación con trastuzumab, el F3'-TriNKET-HER2 proporcionó una lisis específica máxima mayor y valores más potentes de la CE_{50} tanto en células con expresión elevada de HER2 como con poca expresión.

[0246] En la FIG. 11 y la FIG. 12 se muestra la citotoxicidad mediada por F3'-TriNKET-CD33 contra dos estirpes celulares humanas con expresión de CD33, EOL-1 y THP-1, respectivamente. El anticuerpo monoclonal CD33 fue capaz de aumentar la lisis con linfocitos NK de las células seleccionadas como diana EOL-1 (FIG. 11), pero se encontró que fue ineficaz contra la estirpe celular THP-1 con FcR elevado (FIG. 12). El F3'-TriNKET-CD33 proporcionó valores de CE_{50} subnanomolares para la inducción de la citotoxicidad de los NK contra ambas células seleccionadas como diana THP-1 y EOL-1.

Ejemplo 7 - Los F4-TriNKET median la citotoxicidad de los NK

[0247] En este ejemplo se describe la potencia de la mejora con TriNKET en formato F4 bivalente de la destrucción de células cancerosas seleccionadas como diana con linfocitos NK. En este ejemplo se describe la unión del TriNKET con formato F4 bivalente a las células seleccionadas como diana. En este ejemplo se describen los efectos del TriNKET con formato F4 bivalente para estabilizar y mantener una expresión elevada de BCMA de superficie celular. En este ejemplo se describe que la avidez de un TriNKET con formato F4 bivalente por su diana mejora la afinidad con la que TriNKET se une al antígeno seleccionado como diana, lo que en efecto estabiliza la expresión y el mantenimiento del nivel elevado del antígeno seleccionado como diana en la superficie celular.

Estabilización de BCMA de superficie con F4-TriNKET

[0248] Se incubaron células de mieloma KMS12-PE con expresión de BCMA con 10 μ g/ml de F4-TriNKET o anticuerpo monoclonal (EM-901), las muestras se dividieron en tercios y para cada muestra se colocaron partes en hielo durante 20 minutos, a 37 °C durante 2 horas o a 37 °C durante 24 horas. Después del período de incubación, las células se lavaron y se detectó el F4-TriNKET unido usando un anticuerpo secundario contra la IgG humana. Después de la tinción, se fijaron las células y se almacenaron a 4 °C, todas las muestras se analizaron al final del

estudio.

Evaluación de la unión de F4-TriNKET a antígenos humanos de cáncer expresados en células

[0249] Se utilizaron estirpes de células cancerosas humanas que expresaban BCMA para evaluar la unión de antígenos tumorales de F4-TriNKET (*por ejemplo*, A49-F4-TriNKET-BCMA, un dominio de unión a NKG2D del clon ADI-27749 y un dominio de unión a BCMA derivado de EM-901) . La estirpe celular de mieloma múltiple humano MM.1R, que expresaba BCMA a un nivel más elevado que las células de mieloma KMS12-PE, se usó para evaluar la unión de los TriNKET a células que expresan BCMA a un nivel elevado. Los F4-TriNKET se diluyeron y se incubaron con células MM.1R. La unión del F4-TriNKET se detectó usando un anticuerpo secundario contra la IgG humana conjugado con fluoróforo. Las células se analizaron con citometría de flujo, se normalizó la unión de MFI a BCMA expresado en las células a los testigos de anticuerpos secundarios para obtener los valores de múltiplo respecto al antecedente.

Análisis principal de la citotoxicidad de NK humanos

[0250] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucoplaquetarias de sangre periférica humana con centrifugación en gradiente de densidad. Las PBMC aisladas se lavaron y se prepararon para aislar linfocitos NK. Los linfocitos NK se aislaron con una técnica de selección negativa con perlas magnéticas, la pureza de los linfocitos NK aislados fue normalmente > 90 % de CD3-CD56+. Se dejaron en reposo durante la noche los linfocitos NK aislados y se utilizaron al día siguiente en el análisis sobre la citotoxicidad.

[0251] *Análisis sobre citotoxicidad DELFIA*: se recogieron del cultivo las estirpes de células de cáncer humanas que expresan una diana de interés, se lavaron las células con PBS y se volvieron a suspender en medio de cultivo a 10^6 /ml para marcarlas con el reactivo BATDA (Perkin Elmer AD0116). Se siguieron las instrucciones del fabricante para marcar las células seleccionadas como diana. Después de marcarlas, se lavaron 3 veces las células con PBS y se volvieron a suspender a $0,5-1,0 \times 10^5$ /ml en el medio de cultivo. Para preparar los pocillos de fondo, se apartó una parte de las células marcadas y se centrifugaron las células del medio. Se añadieron cuidadosamente 100 µl del medio a los pocillos por triplicado para no alterar las células sedimentadas. Se añadieron 100 µl de células marcadas con BATDA a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Se reservaron pocillos para la

liberación espontánea de las células seleccionadas como diana y se prepararon pocillos para la lisis máxima de las células seleccionadas como diana mediante la adición de Triton-X al 1 %. Los anticuerpos monoclonales o TriNKET contra el tumor seleccionado como diana de interés se diluyeron en medio de cultivo, se añadieron

5 50 µl de mAb diluido o TriNKET a cada pocillo. Se recogieron del cultivo linfocitos NK en reposo y/o activados, se lavaron las células y se volvieron a suspender a 10^5 - $2,0 \times 10^6$ /ml en medios de cultivo en función del cociente E:T deseado. Se añadieron 50 µl de linfocitos NK a cada pocillo de la placa para tener un volumen de cultivo total de 200 µl. La placa se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2-3 horas antes

10 de seguir con el análisis. Después de cultivar durante 2-3 horas, se retiró la placa de la incubadora y las células se sedimentaron 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 añadieron 200 µl de solución de europio a temperatura ambiente a cada pocillo. Se protegió la placa de la luz y se incubó en un

15 agitador de placas a 250 rpm durante 15 minutos. Se leyó la placa con los instrumentos Victor 3 o SpectraMax i3X. Se calculó el % de lisis específica como se muestra a continuación: % de lisis específica = ((liberación experimental – liberación espontánea) / (liberación máxima – liberación espontánea)) * 100 %.

Citotoxicidad de los NK mediada por F4-TriNKET

20 **[0252]** Se analizó la lisis mediada por F4-TriNKET de las células de mieloma con BCMA. En la FIG. 19 se muestra la lisis mediada por F4-TriNKET de células de mieloma KMS12-PE con BCMA mediante células efectoras NK humanas en reposo. En la FIG. 20 se muestra la lisis mediada por F4-TriNKET de células de mieloma MM.1R con BCMA mediante células efectoras NK humanas en reposo. El anticuerpo

25 monoclonal EM-901 se utilizó como testigo en ambos experimentos. En la FIG. 19, se utilizaron células KMS12-PE (poca expresión de BCMA) como células seleccionadas como diana; en la FIG. se utilizaron 20 MM.1R (expresión elevada de BCMA) como células seleccionadas como diana. Tanto contra las células con expresión elevada como con poca expresión de BCMA, MM.1R y KMS12-PE,

30 respectivamente, F4-TriNKET tuvo valores de CE₅₀ subnanomolares. En comparación con un anticuerpo monoclonal contra BCMA EM-901, el F4-TriNKET proporcionó una mayor lisis y potencia específicas máximas contra ambas estirpes celulares.

[0253] En la FIG. 21 se muestra la unión de F4-TriNKET (A49-F4-TriNKET-

BCMA), DuoBody-TriNKET (A49-DB-TriNKET-BCMA) o el anticuerpo monoclonal contra BCMA (EM-901) a las células de mieloma MM.1R. Las tres proteínas pudieron unirse a BCMA que se expresó en las células MM.1R de una manera sensible a la dosis. Las proteínas de unión ávidas fueron capaces de unirse con un múltiplo respecto al antecedente máximo apenas menor en comparación con las proteínas de unión monovalentes, pero la unión ávida proporcionó un valor de unión de CE_{50} mejorado.

Los F4-TriNKET estabilizan BCMA de superficie

[0254] En la FIG. 22 se muestra la tinción de BCMA de superficie con el anticuerpo monoclonal contra BCMA o F4-TriNKET (EM-901) después de la incubación durante el tiempo indicado. Tanto el mAb contra BCMA (EM-901) como el F4-TriNKET pudieron estabilizar el BCMA de superficie rápidamente después de la incubación. El mAb contra BCMA (EM-901) y F4-TriNKET fueron capaces de mantener una mayor expresión superficial de BCMA durante un período de 24 horas.

[0255] En la FIG. 23 se muestra la estabilización de BCMA de superficie en células KMS12-PE después de la incubación con F4-TriNKET o el anticuerpo monoclonal contra BCMA (EM-901). La estabilización inicial de BCMA de superficie celular ocurrió rápidamente después de la exposición a F4-TriNKET o el mAb (EM-901). La unión ávida proporcionada por el F4-TriNKET y el anticuerpo monoclonal (EM-901) mantuvo la expresión elevada de BCMA de superficie durante más tiempo que la unión de a BCMA monovalente, como lo indica el descenso en la expresión de BCMA de superficie a las 24 horas con el DuoBody-TriNKET.

Los F4-TriNKET median una citotoxicidad sustancial a largo plazo

[0256] Análisis de citotoxicidad con citometría de flujo: se recogieron del cultivo estirpes celulares humanas de cáncer que expresaban BCMA y se transdujeron para expresar NucLight Green (Essen BioScience 4475) de forma estable luego de la selección con puromicina, se centrifugaron y se volvieron a suspender a 10^5 /ml en medio de cultivo. Se agregaron 100 μ l de las células seleccionadas como diana a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se diluyeron TriNKET en oposición a BCMA en un medio de cultivo y se añadieron 50 μ l de cada uno a pocillos por duplicado. Se recogieron del cultivo los linfocitos NK que estuvieron en reposo durante la noche, se lavaron y se volvieron a suspender a 4×10^5 /ml en medio de cultivo. Para un cociente de E:T de 2:1, se añadieron 50 μ l de linfocitos NK a todos los pocillos excepto en los testigos que solo contenían la diana, que recibieron 100 μ l de medio de cultivo. La

placa se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 30 horas.

[0257] Después del cultivo conjunto, se tiñeron las células, se fijaron y se analizaron con citometría de flujo. Las células seleccionadas como diana restantes se detectaron con fuertes cambios en el canal FITC, y se excluyeron las células muertas con tinción para determinar la viabilidad. Se exportó el número de eventos verdes y se calculó el % de destrucción en comparación con las muestras de testigo que solo contenían la diana. Se incluyeron perlas de recuento para asegurarse de que los volúmenes registrados fueran comparables.

Los F4-TriNKET median una citotoxicidad sustancial a largo plazo

[0258] En la FIG. 24 y la FIG. 25 se muestra la lisis con linfocitos NK humanos de las estirpes celulares seleccionadas como diana con BCMA con un cociente de E:T de 2:1 en presencia de F4-TriNKET o DB-TriNKET después de 30 horas. En la FIG. 24 se muestra la destrucción de células KMS12-PE (poca expresión de BCMA) en función de la destrucción del testigo sin proteínas, mientras que en la FIG. 25 se utilizaron células MM.1S (mayor expresión de BCMA) como células seleccionadas como diana. En comparación con el DuoBody-TriNKET monovalente, con el F4-TriNKET se demostró un aumento de las estirpes celulares con expresión elevada y con poca expresión de BCMA en todas las concentraciones analizadas.

INCORPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

[0259] La descripción completa de cada uno de los documentos de patente y artículos científicos a los que se hace referencia en la presente se incorporan a modo de referencia a todos los efectos.

EQUIVALENTES

[0260] Es posible llevar a la práctica la invención con otras formas específicas sin apartarse del espíritu ni las características esenciales de esta. Por lo tanto, las modalidades anteriores deben considerarse ilustrativas en todos los aspectos en lugar de limitar la invención descrita en la presente. Por tanto, el alcance de la invención se indica con las reivindicaciones adjuntas más que con la descripción anterior, y todos los cambios que se encuentren en el significado y el intervalo de equivalencias de las reivindicaciones deben incluirse en estas.