

PROTEÍNAS DE UNIÓN MULTIESPECÍFICAS QUE SE UNEN A BCMA, NKG2D Y CD16 Y MÉTODOS DE USO

SOLICITUDES RELACIONADAS

- [01] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud estadounidense n.º de serie 62/716,207 presentada el 8 de agosto de 2018, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

- [02] La presente memoria descriptiva se registra con una copia del formato legible por computadora (CRF, por su sigla en inglés) del Listado de Secuencias. La CRF titulada 14247-425-228_ST25.txt, que fue creada el 8 de agosto de 2019 y tiene 137.008 bytes de tamaño, se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

- [03] La invención se refiere a proteínas de unión multiespecíficas que se unen a NKG2D, CD16 y al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA, por su sigla en inglés). Estas proteínas de unión multiespecíficas exhiben alta potencia y lisis máxima de células objetivo en comparación con anticuerpos monoclonales anti-BCMA, y son útiles para destruir células cancerosas humanas que expresan BCMA.

ANTECEDENTES

- [04] El cáncer sigue siendo un problema de salud significativo a pesar de los importantes esfuerzos de investigación y los avances científicos reportados en la literatura para tratar esta enfermedad. Algunos de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia incluyen cáncer de próstata, cáncer de seno y cáncer de pulmón. 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. Otros tipos de cáncer aún son difíciles de tratar mediante el uso de opciones terapéuticas existentes.
- [05] Las inmunoterapias contra el cáncer son deseables porque son altamente específicas y pueden facilitar la destrucción de las células cancerosas usando el propio sistema inmunitario del paciente. Las proteínas de fusión tales como enlazadores de linfocitos T biespecíficos son inmunoterapias para el cáncer descritas en la literatura que se unen a células tumorales y linfocitos T para facilitar la destrucción de células tumorales. Se ha descrito en la literatura anticuerpos que se unen a determinados antígenos asociados a tumores y a determinadas células inmunes. Ver, por ejemplo, WO 2016/134371 y WO

2015/095412.

[06] 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 virtualmente en todos los tejidos y se caracterizaron originalmente por su capacidad de matar células tumorales de forma eficaz sin la necesidad de sensibilización previa. Los linfocitos NK activados destruyen a las células objetivo por medios similares a los linfocitos T citotóxicos, es decir, a través de gránulos citolíticos que contienen perforina y grancimas, así como a través de vías de receptores de muerte. Los linfocitos NK activados también secretan citocinas inflamatorias como IFN- γ y quimiocinas que promueven el reclutamiento de otros leucocitos al tejido objetivo.

[07] Los linfocitos NK responden a las señales a través de una variedad de receptores activadores e inhibidores en su superficie. Por ejemplo, cuando los linfocitos NK se encuentran con autocélulas sanas, su actividad es inhibida a través de la activación de los receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR). De manera alternativa, cuando los linfocitos NK se encuentran con 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 estimuladoras e inhibidoras.

[08] El BCMA es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia receptora de TNF. Se une específicamente al miembro 13b de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando) (TNFSF13B/TALL-1/BAFF) y que conduce a la activación de NF- κ B y MAPK8/JNK. Su expresión se restringe al linaje de linfocitos B y se ha demostrado que es importante para el desarrollo de los linfocitos B y la respuesta autoinmunitaria. BCMA también se une a varios miembros de la familia TRAF, y por lo tanto transduce señales para la supervivencia celular y la proliferación. El BCMA está implicado en una variedad de tipos de cáncer, tales como mieloma múltiple, linfoma y leucemia. La presente invención proporciona ciertas ventajas para mejorar los tratamientos de los cánceres que expresan BCMA.

COMPENDIO

[09] La invención proporciona proteínas de unión multiespecíficas que se unen a BCMA, por ejemplo, BCMA en una célula cancerosa y al receptor NKG2D y al receptor CD16, expresado en, por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales. Dichas proteínas pueden comprometer más de un tipo de receptor activador de NK y pueden bloquear la unión de ligandos naturales a NKG2D. En determinadas modalidades, las proteínas pueden agonizar los linfocitos NK en humanos y en otras especies, tal como roedores y monos cynomolgus. En determinadas modalidades, las proteínas pueden agonizar los linfocitos T citotóxicos en humanos y en otras especies, tal como roedores y monos cynomolgus. En algunas

modalidades, las proteínas agonizan los linfocitos NK humanos. En algunas modalidades, las proteínas agonizan los linfocitos T citotóxicos humanos. A continuación se describen más detalladamente diversos aspectos y modalidades de la invención.

[010] Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona una proteína que comprender (a) un primer sitio de unión al antígeno que comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a NKG2D; (b) un segundo sitio de unión al antígeno que se une a un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA); y (c) un dominio Fc de anticuerpo, o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende además un sitio de unión al antígeno que se une a BCMA. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno de una proteína descrito en la presente descripción es un fragmento Fab que se une a BCMA. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno de una proteína y el adicional descritos en la presente descripción son fragmentos Fab que se unen a BCMA.

[011] En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno de una proteína y el adicional descritos en la presente descripción son scFv que se unen a BCMA. En determinadas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D se ubica en el extremo N o el extremo C del dominio variable de cadena pesada del scFv. En determinadas modalidades, el dominio variable de cadena ligera se ubica en el extremo N del dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D.

[012] En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16 o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al extremo C del dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16 o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante un enlazador flexible que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168. En determinadas modalidades, el enlazador flexible que se une al extremo C del dominio Fc al extremo N del dominio V_L del scFv que se une a NKG2D (por ejemplo, la SEQ ID NO:98) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168. En determinadas modalidades, el extremo C del dominio Fc del anticuerpo está unido al extremo N del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D.

[013] En determinadas modalidades, dentro del scFv que se une a NKG2D, se forma un puente disulfuro entre el dominio variable de cadena pesada del scFv y el dominio variable de cadena ligera del scFv. En determinadas modalidades, el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de cadena pesada y C100 del dominio variable de cadena ligera.

- [014]** En determinadas modalidades, dentro del scFv que se une a NKG2D, el dominio variable de la cadena pesada se une al dominio variable de la cadena ligera mediante un enlazador flexible. En determinadas modalidades, el enlazador flexible comprende $(\text{GlyGlyGlyGlySer})_n$ $((\text{G4S})_n$; SEQ ID NO:198), donde n es un número entero entre 1-10. En determinadas modalidades, el enlazador flexible tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:167.
- [015]** En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen al dominio Fc del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [016]** En determinadas modalidades, un puente de disulfuro se forma entre el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno y/o el sitio de unión al antígeno adicional. En determinadas modalidades, el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de cadena pesada y C100 del dominio variable de cadena ligera.
- [017]** En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena ligera ubicado en el extremo N de un dominio variable de cadena pesada, donde el dominio variable de cadena ligera se une al dominio variable de cadena pesada del scFv mediante un enlazador flexible que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:167, y scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc de anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [018]** En determinadas modalidades, una proteína de la presente invención que comprende un primer sitio de unión al antígeno que comprende un scFv que se une a NKG2D, comprende:
- (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de la región determinante de complementariedad 1 (CDR1), la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) y la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 191, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;
 - (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 193, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:

99, 100 y 101, respectivamente;

(c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 95, 96 y 97, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 188, 88 y 189, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente;

(e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 104 y 192, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 107, 108 y 109, respectivamente;

(f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 72 y 159, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 75, 76 y 77, respectivamente;

(g) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 186, 80 y 187, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente;

(h) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 194, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(i) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 195, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(j) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y

CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 196, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(k) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 197, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; o

(l) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 160, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; y

un segundo sitio de unión al antígeno y/o un adicional que se une a BCMA comprende:

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 149, 150 y 151, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente;

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 1117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 123, respectivamente;

(c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 129, 130 y 131, respectivamente;

(d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 133, 134 y 135, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, respectivamente;

(e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 141, 142 y 143,

respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 145, 146 y 147, respectivamente; o

(f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 122, respectivamente.

- [019] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [020] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163, y la SEQ ID NO:165.
- [021] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [022] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [023] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [024] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162, y comprende además la SEQ ID NO:163 y SEQ ID NO:165.
- [025] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:94.
- [026] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a

NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción comprende un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[027] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98 % idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[028] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una

proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[029] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[030] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena

ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[031] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[032] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95

%, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:98. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[033] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:152. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:152. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:152. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:152. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:152.

[034] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable

de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:119. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:119. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:119. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:119. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:119.

[035] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:128. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:128. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:128. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:128. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:128.

[036] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un

segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:136. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:136. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:136. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:136. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:136.

- [037] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:144. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:144. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:144. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:144. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:144.

[038] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:118. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:118. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 98% idéntico a la SEQ ID NO:118. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 99% idéntico a la SEQ ID NO:118. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un primer sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:118.

[039] En determinadas modalidades, la proteína comprende además un sitio de unión al antígeno que se une a BCMA. En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno adicional comprende el mismo CDR1, CDR2, y CDR3 del dominio variable de cadena pesada y el mismo CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA. En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno adicional comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) al dominio variable de cadena pesada del segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico) al dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA. En determinadas modalidades, el sitio de unión al antígeno adicional comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico al dominio variable de cadena pesada del segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, y un dominio variable de cadena ligera idéntico al dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA.

[040] Las proteínas descritas en la presente comprenden un dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión a antígenos que se une a CD16. En determinadas modalidades, las proteínas descritas en la presente

comprenden un dominio Fc de anticuerpo. El dominio Fc de anticuerpo puede unirse a CD16. En determinadas modalidades, las proteínas descritas en la presente comprenden una parte de un dominio Fc de anticuerpo que retiene la afinidad de unión del dominio Fc de anticuerpo a CD16, es decir, suficiente para unirse a CD16. En determinadas modalidades, las proteínas descritas en la presente comprenden un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16. En determinadas modalidades, el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 comprende un fragmento Fab. En determinadas modalidades, el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 comprende un scFv.

[041] En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16 o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D se une al extremo C del dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16 o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante un enlazador flexible. En determinadas modalidades, el enlazador flexible comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168. En determinadas modalidades, el extremo C del dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 está unido al extremo N del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D. En determinadas modalidades, el enlazador flexible que se une al extremo C del dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16, al extremo N del dominio V_L del scFv que se une a NKG2D (por ejemplo, la SEQ ID NO:98) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

[042] En determinadas modalidades, las proteínas descritas en la presente comprenden un dominio Fc de anticuerpo. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D está vinculado al dominio Fc del anticuerpo. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D está vinculado al dominio Fc del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser. En determinadas modalidades, el scFv que se une a NKG2D está vinculado al extremo C del dominio Fc del anticuerpo mediante un enlazador flexible. En determinadas modalidades, el enlazador flexible comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168. En determinadas modalidades, el extremo C del dominio Fc del anticuerpo está unido al extremo N del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D. En determinadas modalidades, el enlazador flexible que se une al extremo C del dominio Fc al extremo N del dominio V_L del scFv que se une a NKG2D (por ejemplo, la SEQ ID NO:98) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.

[043] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un

dominio Fc de anticuerpo que comprende los dominios CH2 y bisagra de un anticuerpo IgG1 humano.

- [044] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo IgG1 humano. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo IgG1 humano. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98 % idéntica a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo IgG1 humano. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 98 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana. En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, T350, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411, y K439.
- [045] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende sustituciones Q347R, D399V y F405T. Una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende las sustituciones Q347R, D399V y F405T, unidas a un scFv que se une a NKG2D.
- [046] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende sustituciones K360E y K409W.
- [047] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción incluye un dominio Fc que comprende las sustituciones K360E y K409W, unidas al segundo sitio de unión al antígeno.
- [048] En determinadas modalidades, el primer sitio de unión al antígeno se une a NKG2D con una K_D de 2 a 120 nM, medido por resonancia de plasmones superficiales. En determinadas modalidades, la proteína se une a NKG2D con una K_D de 2 a 120 nM, medido por resonancia de plasmones superficiales.
- [049] También se proporcionan formulaciones que contienen al menos una de estas proteínas; las células que contienen al menos uno o más ácidos nucleicos que expresan estas proteínas, y métodos para potenciar la muerte de células tumorales usando estas proteínas.

[050] En un aspecto adicional de la invención, la presente descripción proporciona un método para tratar el cáncer, en el que una proteína de la presente descripción o una formulación, que comprende una proteína de la presente descripción se administra a un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer expresa BCMA. En algunas modalidades, al menos 20 % de las células del cáncer expresa BCMA. En algunas modalidades, al menos 50 % de las células del cáncer expresa BCMA. En algunas modalidades, al menos 80 % de las células del cáncer expresa BCMA.

[051] En determinadas modalidades, una proteína de la presente descripción se usa para tratar un cáncer seleccionado de mieloma múltiple, leucemia mielomonocítico grave, linfoma de linfocitos T, leucemia monocítica grave, y linfoma folicular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[052] **Las FIGURAS 1A-1B** ilustran anticuerpos triespecíficos de ejemplo (TriNKET), que incluyen un primer sitio de unión al antígeno scFv que se une a NKG2D, un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, un sitio de unión al antígeno asociado al tumor adicional que se une a BCMA, y una región constante de anticuerpo heterodimerizado que se une a CD16. Estos formatos de anticuerpos se denominan aquí F4-TriNKET. **La Figura 1A** ilustra los dos sitios de unión a BCMA en formato Fab. **La Figura 1B** ilustra los dos sitios de unión a BCMA en formato scFv.

[053] **La Figura 2** ilustra un TriNKET de ejemplo que contiene un primer sitio de unión al antígeno scFv que se une a NKG2D, un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, y una región constante de anticuerpo heterodimerizado. El formato del anticuerpo se denomina en la presente F3-TriNKET.

[054] **La Figura 3** muestra que TriNKET dirigido a BCMA (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA (en breve NKG2D-F4-TriNKET-BCMA) media una lisis más potente de células de mieloma KMS12-PE BCMA positivas que mAb anti-BCMA.

[055] **La Figura 4** muestra que TriNKET dirigido a BCMA media una lisis más potente de células de mieloma MM.1R BCMA positivas que mAb anti-BCMA.

[056] **La Figura 5** muestra que la incubación con el anticuerpo dirigido a BCMA y TriNKET aumentó la expresión total de BCMA en la superficie de forma estable a lo largo del tiempo en las células de mieloma KMS12-PE.

[057] **La Figura 6** muestra que la incubación con el anticuerpo dirigido a BCMA y TriNKET aumentó la expresión total de BCMA en la superficie de forma estable a lo largo del tiempo en las células de mieloma MM.1R.

[058] **La Figura 7** muestra que la prolongación del tiempo de incubación con TriNKET bivalente aumentó drásticamente la cantidad de TriNKET unida a las células de mieloma KMS12-PE.

- [059] **La Figura 8** muestra que la prolongación del tiempo de incubación con TriNKET bivalente aumentó drásticamente la cantidad de TriNKET unida a las células de MM.1R.
- [060] **La Figura 9** muestra que TriNKET bivalente (formato F4) superó el mAb bivalente dirigido a BCMA y TriNKET monovalente en el ensayo de destrucción de NK purificado a largo plazo.
- [061] **La Figura 10** muestra que BCMA–TriNKET retuvo la eficacia en el ensayo de citotoxicidad a largo plazo con células efectoras de PBMC recientes.
- [062] **La Figura 11** muestra una unión débil (por debajo del límite de detección) de TriNKET dirigido a BCMA a NKG2D expresado en células KHYG-1.
- [063] **La Figura 12** muestra muy poca unión de TriNKET bivalente dirigido a BCMA (formato F4) más allá de la unión de Fc mAb a células KHYG-1 transducidas para expresar CD16.
- [064] **Las Figuras 13A-13F** muestran unión insignificante en la sangre entera de TriNKET dirigido a BCMA (borde sólido, gris oscuro) más allá del fondo (borde discontinuo, blanco) a los linfocitos NK (**Figura 13A**), linfocitos T CD8+ (**Figura 13B**), y linfocitos T CD4+ (**Figura 13C**). Dada la proximidad al control de IgG1 (borde punteado, gris claro) la unión a los linfocitos B (**Figura 13D**), monocitos (**Figura 13E**), y granulocitos (**Figura 13F**) está mayormente mediada por el receptor Fc.
- [065] **La Figura 14** muestra la pureza de los linfocitos T efectoras CD8+ y la expresión objetivo. Tal como se muestra, los linfocitos T efectoras CD8+ generados con estimulación ConA y cultivados con IL-15 eran de alta pureza (> 99 % de células CD3+CD8+), y todas expresaban NKG2D pero no CD16.
- [066] **Las Figuras 15A-15B** muestran la citólisis de células KMS12-PE en el ensayo DELFIA. Los ensayos de citotoxicidad de DELFIA se realizaron con linfocitos T efectoras CD8+ primarios humanos derivados de dos donantes sanos y células objetivo KMS12–PE. **La Figura 15A** describe resultados para células que derivan del donante 1 y la **Figura 15B** describe resultados para células que derivan del donante 2. Tal como se muestra, NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA mejoró la lisis de las células KMS12-PE cuando se cultivaron de forma conjunta con los linfocitos T CD8+ activados, pero no en ausencia de células efectoras. El mAb anti-BCMA parental o el TriNKET irrelevante no pudo mejorar la lisis por los linfocitos T CD8+ de ninguno de los donantes.
- [067] **Las Figuras 16A-16B** muestran la activación de linfocitos NK humanos en presencia de líneas celulares objetivo BCMA positivas en presencia de TriNKET anti-BCMA o anticuerpo monoclonal en 4 horas. La **Figura 16A** representa los resultados con células KMS12-PE (baja expresión de BCMA) como células objetivo. La **FIGURA 16B** representa los resultados con H929 (alta expresión de BCMA) como células objetivo. Tal como se muestra, contra las células que expresan BCMA tanto altas como bajas, el F4-TriNKET desencadenó un aumento

en la desgranulación y la producción de IFN γ con un valor subnanomolar de EC₅₀. En comparación con un anticuerpo monoclonal BCMA, el F4 TriNKET estimuló una mayor proporción de linfocitos NK al máximo con una potencia mejorada contra ambas líneas celulares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[068] La invención proporciona proteínas de unión multiespecíficas que se unen a BCMA, receptor NKG2D, y receptor CD16. Las proteínas de unión multiespecíficas que se unen a un BCMA en una célula cancerosa y al receptor NKG2D y al receptor CD16 en un linfocito citolítico natural para activar el linfocito citolítico natural. Las proteínas de unión multiespecíficas también se pueden unir a BCMA en una célula cancerosa y al receptor NKG2D y al receptor CD16 en un linfocito T citotóxico para activar el linfocito T citotóxico. También se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas de unión multiespecíficas, y métodos terapéuticos utilizando tales proteínas multiespecíficas y composiciones farmacéuticas, que incluye para el tratamiento del cáncer. A continuación se indican diversos aspectos de la invención en secciones. No obstante, los aspectos de la invención descritos en una sección particular no se deben limitar a ninguna sección particular.

[069] Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen diversos términos y expresiones:

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

[071] Como se usa en este documento, el término “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 de extremo N (“V”) de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres extensiones altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se mencionan como “regiones hipervariables” que están interpuestas entre extensiones flanqueantes más conservadas conocidas como “regiones marco” o “FR”. Por lo tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre regiones hipervariables y adyacentes a estas en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo humano, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional para formar 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 “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. En determinados animales, tales como camélidos y peces cartilaginosos, el sitio de unión al antígeno se forma mediante una única

cadena de anticuerpo proporcionando un "anticuerpo de dominio único". Los sitios de unión al antígeno pueden existir en un anticuerpo intacto, en un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo que retiene la superficie de unión al antígeno, o en un polipéptido recombinante tal como un scFv, usando un enlazador peptídico para conectar el dominio variable de la cadena pesada al dominio variable de la cadena ligera en un único polipéptido. Todas las posiciones de los aminoácidos en las regiones variables de cadena ligera o pesada que se describen en la presente se numeran de acuerdo con la numeración de Kabat.

[072] El término "antígeno asociado a tumor" tal como se usa en la presente significa cualquier antígeno que incluye, de modo no taxativo, una proteína, glucoproteína, gangliósido, carbohidrato, lípido que está asociado con cáncer. Dicho antígeno puede expresarse en células malignas o en el microambiente tumoral, como en los vasos sanguíneos asociados al tumor, la matriz extracelular, el estroma mesenquimatoso o los infiltrados inmunes.

[073] Tal como se usa en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un organismo a tratar mediante los métodos y composiciones descritos en la presente. Tales organismos incluyen preferentemente, de modo no taxativo, mamíferos (por ejemplo, murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares), y más preferentemente incluyen humanos.

[074] Tal como se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un agente (por ejemplo, una proteína de la presente invención) suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. El término cuando se usa relacionado con un agente terapéutico se refiere a una cantidad de tal agente suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento de la enfermedad o un trastorno, o para demorar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración particular. Tal como se usa en la presente, el término "tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminución, reducción, modulación, mejora o eliminación, que produce la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares o de un síntoma de estos.

[075] Tal como se usa en la presente, el término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*.

[076] Tal como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tal como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de portadores,

estabilizadores y adyuvantes, ver por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975].

[077] Tal como se usa en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, ácido o base) de un compuesto de la presente invención que, tras la administración a un sujeto, es capaz de proporcionar un compuesto de esta invención o un metabolito activo o residuo de este. Tal como reconocen los expertos en la técnica, las "sales" de los compuestos de la presente invención pueden obtenerse a partir de bases y ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ácidos de ejemplo incluyen, de modo no taxativo, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, toluenos-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, ácido fórmico, benzoico, malónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Pueden emplearse otros ácidos, tales como el oxálico, aunque no sean farmacéuticamente aceptables en sí mismos, en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

[078] Las bases de ejemplo incluyen, de modo no taxativo, hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amoníaco y compuestos de la fórmula NW_4^+ , donde W es alquilo C_{1-4} , y similares.

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

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

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

la presente invención que consisten esencialmente en, o consisten en, los pasos de procesamiento mencionados.

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

I. PROTEÍNAS

- [083] La invención proporciona proteínas de unión multiespecíficas que se unen a BCMA en una célula cancerosa y al receptor NKG2D y al receptor CD16 en linfocitos citolíticos naturales para activar el linfocito citolítico natural. Las proteínas de unión multiespecífica son útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos descritos en la presente. La unión de la proteína de unión multiespecífica al receptor NKG2D y al receptor CD16 en el linfocito citolítico natural mejora la actividad del linfocito citolítico natural hacia la destrucción de una célula cancerosa. La unión de la proteína de unión multiespecífica a BCMA en una célula cancerosa acerca la célula cancerosa al linfocito citolítico natural, lo que facilita la destrucción directa e indirecta de las células cancerosas por los linfocitos citolíticos naturales.

- [084] Las proteínas de unión multiespecíficas proporcionadas en la presente también se pueden unir a BCMA en una célula cancerosa y al receptor NKG2D y al receptor CD16 en linfocitos T citotóxicos para activar el linfocito T citotóxico. Las proteínas de unión multiespecífica son útiles en las composiciones farmacéuticas y métodos terapéuticos descritos en la presente. La unión de la proteína de unión multiespecífica al receptor NKG2D y al receptor CD16 en el linfocito T citotóxico mejora la actividad del linfocito T citotóxico hacia la destrucción de una célula cancerosa. La unión de la proteína de unión multiespecífica a BCMA en una célula cancerosa acerca la célula cancerosa al linfocito T citotóxico, lo que facilita la destrucción de las células cancerosas por los linfocitos T citotóxicos.

- [085] Se proporciona a continuación una descripción adicional de las proteínas de unión multiespecíficas de ejemplo.

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

- [087] El segundo componente de las proteínas de unión multiespecíficas se une a las células que expresan BCMA, que pueden incluir, de modo no taxativo, mieloma múltiple y tumores malignos de linfocitos B.

- [088] El tercer componente para las proteínas de unión multiespecíficas se une a las células que expresan CD16, un receptor Fc en la superficie de los leucocitos, que incluye linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y células

dendríticas foliculares.

[089] Las proteínas de unión multiespecíficas descritas aquí pueden tomar varios formatos. **La Figura 1A** ilustra a F4 TriNKET con dos sitios de unión al antígeno que se unen a BCMA, donde ambos sitios de unión al antígeno que se unen a BCMA son un fragmento Fab. El F4 TriNKET (Fab) incluye un primer sitio de unión al antígeno que une NKG2D, que comprende un scFv, un segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA, un sitio de unión al antígeno adicional que se une a BCMA, y una región constante de anticuerpo heterodimerizado que se une a CD16. El F4 TriNKET (Fab) es un anticuerpo heterodimérico multiespecífico que incluye cuatro péptidos: una primera cadena pesada de inmunoglobulina, una segunda cadena pesada de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (Figura 1A). La primera cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un dominio variable de cadena pesada (VH) unido a una región constante de cadena pesada 1 (CH1) que forma un primer dominio (VH-CH1), y un primer dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), donde el primer dominio (VH-CH1) se empareja con la primera cadena ligera para formar un primer Fab que se une a BCMA, y donde el dominio (VH-CH1) está unido al primer Fc mediante un enlazador o una bisagra (Figura 1A). La segunda cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un segundo dominio (VH-CH1), un segundo dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), y un fragmento variable de cadena única (scFv) que está compuesto por un VH y un VL que se emparejan y se unen a la NKG2D, donde el segundo dominio Fc está unido mediante un enlazador o una bisagra en su extremo N al segundo dominio (VH-CH1), y mediante un enlazador o una bisagra en su extremo C al scFv que se une a NKG2D, y donde el segundo dominio (VH-CH1) se empareja con la segunda cadena ligera para formar un segundo Fab que se une a BCMA (Figura 1A).

[090] El F4 TriNKET (scFv) es un anticuerpo heterodimérico multiespecífico que incluye dos péptidos: una primera cadena pesada de inmunoglobulina, una segunda cadena pesada de inmunoglobulina (Figura 1B). La primera cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un primer scFv que se une a BCMA y un primer dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), donde el primer scFv que se une a BCMA está unido al primer Fc mediante ya sea un enlazador o una bisagra (Figura 1B). La segunda cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un segundo scFv que se une a BCMA, un segundo dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), y un scFv que se une a la NKG2D, donde el segundo dominio Fc está unido mediante un enlazador o una bisagra en su extremo N al segundo dominio scFv que se une a BCMA, y mediante un enlazador o una bisagra en su extremo C al scFv que se une a NKG2D (Figura 1B).

[091] Los TriNKET denominados "NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA" pueden referirse a los TriNKET representados en la Figura 1A (NKG2D-unión-F4 (Fab)-TriNKET-BCMA) o en la Figura 1B (NKG2D-unión-F4 (scFv)-TriNKET-BCMA). Por ejemplo, el TriNKET "A49-F4-

TRINKET-BCMA” se refiere a un TriNKET que tiene el formato “NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA”, y tiene un dominio de unión a NKG-2D que comprende el VH y VL de A49 (Ver la Tabla 1 debajo).

- [092] En algunas modalidades, el fragmento variable monocatenario (scFv) descrito anteriormente está unido al 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. La secuencia de bisagra puede proporcionar flexibilidad de unión al antígeno objetivo, y equilibrio entre flexibilidad y geometría óptima.
- [093] En algunas modalidades, el fragmento variable monocatenario (scFv) descrito anteriormente incluye un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera. En algunas modalidades, 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 cadena pesada y el residuo C100 del dominio variable de cadena ligera. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada se une al dominio variable de cadena ligera mediante un enlazador flexible. Puede usarse cualquier enlazador adecuado, por ejemplo, el enlazador (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.
- [094] Las proteínas de unión multiespecíficas pueden proporcionar acoplamiento bivalente o monovalente de BCMA. El acoplamiento bivalente de BCMA por parte de las proteínas multiespecíficas puede estabilizar el BCMA en la superficie de las células cancerosas y mejorar la citotoxicidad de los linfocitos NK hacia las células cancerosas. El acoplamiento bivalente de BCMA por las proteínas multiespecíficas puede conferir una unión más fuerte de las proteínas multiespecíficas a las células cancerosas, lo que facilita una respuesta citotóxica más fuerte de los linfocitos NK hacia las células cancerosas, especialmente hacia las células cancerosas, que expresan un nivel bajo de BCMA. El acoplamiento bivalente de BCMA por parte de las proteínas multiespecíficas proporcionadas en la presente también puede mejorar la citotoxicidad de los linfocitos T citotóxicos hacia las células cancerosas. El acoplamiento bivalente de BCMA por las proteínas multiespecíficas puede conferir una unión más fuerte de las proteínas multiespecíficas a las células cancerosas, lo que facilita una respuesta citotóxica más fuerte de los linfocitos T citotóxicos hacia las células cancerosas.
- [095] Dentro del dominio Fc, la unión de CD16 está mediada por la región bisagra y el dominio CH2. Por ejemplo, dentro de la IgG1 humana, la interacción con el 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 (ver, Sonderrmann *et ál.*, Nature, 406 (6793):267-273). En función de los dominios conocidos, las mutaciones se pueden seleccionar para mejorar o reducir la afinidad de unión a CD16, como mediante el uso de bibliotecas con fagos o bibliotecas de ADNc con superficie de levadura, o se pueden diseñar en función de la estructura tridimensional conocida de la Interacción.

[096] En algunas modalidades, el dominio constante de anticuerpo comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de un anticuerpo de IgG, por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 humana. En algunas modalidades, las mutaciones se introducen en el dominio constante de anticuerpo para permitir la heterodimerización con otro dominio constante de 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 IgG1 humano, y difiere en uno o más posiciones seleccionadas del grupo que consta de Q347, Y349, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439. Todas las posiciones de los aminoácidos en un dominio Fc o región bisagra que se describen en la presente se numeran de acuerdo con la numeración de EU.

[097] 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 IgG1 humano, 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.

[098] A continuación se enumeran ejemplos del scFv ligado a una región constante de anticuerpo que también incluye mutaciones que permiten la heterodimerización de dos cadenas polipeptídicas. El scFv que contiene un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) de NKG2D se usa para preparar una proteína multiespecífica de la presente descripción. 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 100 V_L - 44 V_H S-S (subrayado), y pueden ser de cualquier anticuerpo de unión a NKG2D o dirigido a un tumor. El Ala-Ser (AS, en **negrita y subrayado**) se incluye en la secuencia de la región bisagra del codo para equilibrar la flexibilidad y la geometría óptima. En determinadas modalidades, se puede añadir una secuencia adicional Thr-Lys-Gly a la

secuencia AS en la bisagra. El enlazador (G4S)₄ está subrayado en las secuencias enumeradas en el párrafo siguiente.

[099] Un TriNKET de la presente descripción es un NKG2D-uni6n-F4-TriNKET-BCMA, A49-F4-TriNKET-BCMA, que comprende un primer polip6ptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:162 (F4-BCMAFc-AJchainB-NKG2D-uni6n scFv), un segundo polip6ptido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:163 (Anti-BCMA HC-bisagra-Fc), y un tercer y un cuarto polip6ptido cada uno que comprende la secuencia de la SEQ ID NO:165 (Anti-BCMA-Whole LC).

[0100] El primer polip6ptido, es decir scFv que se une a F4-BCMAFc-AJchainB-NKG2D (SEQ ID NO:162) y el tercer polip6ptido, es decir, Anti-BCMA-Whole LC, forman un primer fragmento Fab dirigido a BCMA (que incluye una parte de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) (SEQ ID NO:148) y un dominio CH1, y una parte de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO:152) y un dominio constante de cadena ligera). El scFv que se une a F4-BCMAFc-AJchainB-NKG2D comprende la parte de cadena pesada (VH-CH1) conectada a un dominio Fc (bisagra-CH2-CH3), que en el extremo C del Fc est6 unido a un fragmento variable de cadena 6nica (scFv) que se une a NKG2D. El scFv que se une a NKG2D est6 representado por la secuencia de amino6cidos de la SEQ ID NO:161, e incluye un dominio variable de cadena ligera (V_L) (SEQ ID NO:98) unido a un dominio variable de cadena pesada (V_H) (SEQ ID NO:94) mediante un enlazador (G4S)₄. Tal como se representa en la SEQ ID NO:162, el extremo C del dominio Fc est6 unido al extremo N del dominio V_L (SEQ ID NO:98) mediante el uso de un enlazador corto SGSGGGGS (SEQ ID NO:168).

scFv de uni6n a NKG2D

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSS
YIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPPWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:161)

scFv de uni6n a F4-BCMAFc-AJchainB-NKG2D

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSSTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGT LTVSSASTKG
PSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG
 SGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
 QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGG
 GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEW
 VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWF
 DPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:162)

[0101] El scFv en el NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA incluye un dominio variable de cadena ligera de un sitio de unión a NKG2D conectado a un dominio variable de cadena pesada con un enlazador (G4S)₄ (representado como (V_L(G4S)₄V_H)). Los dominios variables ligeros y pesados del scFv (SEQ ID NO:162) está conectados como V_L-(G4S)₄-V_H; V_L y V_H contienen 100V_L - 44V_H puente S-S (que es resultado de las sustituciones G100C y G44C, respectivamente) (residuos de cisteína están en negrita-cursiva-subrayados). (G4S)₄ es la secuencia en cursiva GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:164) en la SEQ ID NO:161 y SEQ ID NO:162. El dominio Fc en la SEQ ID NO:162 comprende una sustitución S354C, que forma un enlace de disulfuro con una sustitución Y349C en otro dominio Fc (SEQ ID NO: 163, descrito más adelante). El dominio Fc en la SEQ ID NO:162 incluye las sustituciones Q347R, D399V, y F405T.

[0102] El segundo polipéptido, es decir, Anti-BCMA VH-CH1-Fc, y el cuarto polipéptido, es decir, Anti-BCMA-Whole LC, forma un segundo fragmento Fab de unión a BCMA. El anti-BCMA VH-CH1-Fc incluye una parte de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO:148) y un dominio CH1, donde el dominio variable de cadena pesada está conectado al dominio CH1, y el dominio CH1 está conectado al dominio Fc. Anti-BCMA-Whole LC incluye una parte de cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO:152) y un dominio constante de cadena ligera.

Anti-BCMA V_H-CH1-Fc

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSDNAMGWVRQAPGKGLEWVSAISGPSSTYY
 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFDYWGQGTLVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTEENQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:163)

[0103] La SEQ ID NO:163 representa la parte de cadena pesada del segundo fragmento Fab anti-BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 148) de

un sitio de unión a BCMA y un dominio CH1, conectado a un dominio Fc (bisagra-CH2-CH3). El dominio Fc en la SEQ ID NO:163 incluye una sustitución Y349C, que forma un enlace disulfuro con una sustitución S354C en el dominio CH3 de la Fc unida al scFv de unión a NKG2D (SEQ ID NO:162). En la SEQ ID NO:163, el dominio Fc también incluye las sustituciones K360E y K409W.

- [0104] La SEQ ID NO:165 representa la parte de cadena ligera de un fragmento Fab que comprende un dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO:152) de un sitio de unión a BCMA y un dominio constante de cadena ligera.

Anti-BCMA-Whole LC

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSDEYLSWYQQKPGQAPRLLIHSASTRATGIPDRF
SGSGSGTDFTLAISRLEPEDFAVYYCQQYGYPDFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:165)

- [0105] En una modalidad de ejemplo, el dominio Fc unido al fragmento scFv de unión a NKG2D comprende las mutaciones de K360E y K409W, y el dominio Fc unido al fragmento Fab de BCMA comprende mutaciones coincidentes Q347R, D399V y F405T para formar un heterodímero.
- [0106] En una modalidad de ejemplo, el dominio Fc unido al scFv de unión a NKG2D incluye una sustitución Y349C en el dominio CH3, que forma un enlace disulfuro con una sustitución S354C en el Fc unido al fragmento Fab de unión a BCMA.
- [0107] El F3 TriNKET es un anticuerpo heterodimérico multiespecífico que incluye tres péptidos: una primera cadena pesada de inmunoglobulina, una segunda cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina (Figura 2). La primera cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un scFv que se une a NKG2D y un primer dominio Fc (CH2-CH3), donde el scFv que se une a NKG2D está unido al primer Fc mediante ya sea un enlazador o una bisagra (Figura 2). La segunda cadena pesada de inmunoglobulina incluye, del extremo N al extremo C, un dominio (VH-CH1), y un segundo dominio Fc (CH2-CH3), donde el segundo dominio Fc está unido mediante un enlazador o una bisagra en su extremo N al dominio (VH-CH1), y donde el dominio (VH-CH1) se acopla con la cadena ligera para formar un Fab que se une a BCMA (Figura 2). Los TriNKET denominados “NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA” pueden referirse a los TriNKET descritos en la Figura 2. Otro TriNKET de ejemplo de la presente descripción es NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA, secuencias de las cuales se describen más adelante (Las CDR (numeración de Kabat) están subrayadas).

[0108] Un NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA de ejemplo incluye un fragmento Fab de uni3n a BCMA que incluye una parte de cadena pesada que comprende un dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO:148) y un dominio CH1, y una parte de la cadena ligera que comprende un dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO:152) y un dominio constante de cadena ligera, donde el dominio variable de cadena pesada se conecta al dominio CH1, y el dominio CH1 se conecta al dominio Fc. NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA tambi3n comprende un scFv de uni3n a NKG2D unido a un dominio Fc (SEQ ID NO: 166).

La SEQ ID NO:163 representa una segunda cadena pesada de inmunoglobulina de ejemplo de NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA tal como se ilustra en la Figura 2, que incluye la parte de cadena pesada de un fragmento Fab anti-BCMA, que comprende un dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 148) de un sitio de uni3n a BCMA y un dominio CH1, conectado a un dominio Fc. El dominio Fc en la SEQ ID NO:163 incluye una sustituci3n Y349C, que forma un enlace disulfuro con una sustituci3n S354C en el dominio CH3 de la Fc unida al scFv de uni3n a NKG2D (SEQ ID NO:166) para formar el NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA. En la SEQ ID NO:163, el dominio Fc tambi3n incluye las sustituciones K360E y K409W.

[0109] En una primera cadena pesada de inmunoglobulina de ejemplo de NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA, el scFv en el NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA incluye un dominio variable de cadena ligera de un sitio de uni3n a NKG2D conectado a un dominio variable de cadena pesada con un enlazador (G4S)₄ (SEQ ID NO:164) (representado como (V_L(G4S)₄V_H)), que est3 unido a un dominio Fc. En NKG2D-uni3n-F3-TriNKET-BCMA, los dominios variables ligeros y pesados del scFv (SEQ ID NO:161) est3 conectados como V_L-(G4S)₄-V_H; V_L y V_H contienen 100V_L - 44V_H puente S-S (que es resultado de las sustituciones G100C y G44C, respectivamente) (residuos de ciste3na est3n en negrita-cursiva-subrayados); y V_H se conecta al dominio Fc mediante un Ala-Ser.

[0110] La SEQ ID NO:166 representa la secuencia completa de un scFv de uni3n a NKG2D unido a un dominio Fc mediante una bisagra que comprende Ala-Ser (scFv-Fc). El dominio Fc unido a scFv incluye las sustituciones Q347R, D399V, y F405T.

scFv-Fc-AJchainB de uni3n a NKG2D-F3- [V_L(G4S)₄V_H]

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGVSPRTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKCLEWVSSISSSSS
YIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPMGAAAGWFDPPWGQGT
LTVSSASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLVS

DGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:166)

- [0111]** En una modalidad de ejemplo de un NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA, el dominio Fc de la primera cadena pesada de inmunoglobulina, que está unido al fragmento scFv de unión a NKG2D comprende las mutaciones de K360E y K409W, y el dominio Fc de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, que está unido al fragmento Fab de BCMA comprende mutaciones coincidentes Q347R, D399V y F405T para formar un heterodímero.
- [0112]** En una modalidad de ejemplo de un NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA, el dominio Fc de la primera cadena pesada de inmunoglobulina, que está unido al scFv de unión a NKG2D incluye una sustitución Y349C en el dominio CH3, que forma un enlace disulfuro con una sustitución S354C en el dominio Fc de la segunda cadena pesada de inmunoglobulina, que está unido al fragmento Fab de unión a BCMA.
- [0113]** Las proteínas de unión multiespecíficas pueden unirse a las células que expresan el receptor NKG2D, que pueden incluir, de modo no taxativo, linfocitos NK, linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T $\alpha\beta$ CD8⁺. Tras la unión de NKG2D, las proteínas de unión multiespecífica pueden bloquear ligandos naturales, tales como ULBP6 y MICA, de la unión a NKG2D y activar receptores de NKG2D.
- [0114]** Las proteínas de unión multiespecíficas se unen a células que expresan CD16, un receptor Fc en la superficie de los leucocitos, incluidos los linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y células dendríticas foliculares.
- [0115]** Una proteína de la presente descripción se une a NKG2D con una afinidad de K_D de 10 nM o menor, por ejemplo, alrededor de 10 nM, alrededor de 9 nM, alrededor de 8 nM, alrededor de 7 nM, alrededor de 6 nM, alrededor de 5 nM, alrededor de 4,5 nM, alrededor de 4 nM, alrededor de 3,5 nM, alrededor de 3 nM, alrededor de 2,5 nM, alrededor de 2 nM, alrededor de 1,5 nM, alrededor de 1 nM, entre alrededor de 0,5 nM – alrededor de 1 nM, alrededor de 1 nM – alrededor de 2 nM, alrededor de 2 nM – 3 nM, alrededor de 3 nM – 4 nM, alrededor de 4 nM – alrededor de 5 nM, alrededor de 5 nM – alrededor de 6 nM, alrededor de 6 nM – alrededor de 7 nM, alrededor de 7 nM – alrededor de 8 nM, alrededor de 8 nM – alrededor de 9 nM, alrededor de 9 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 1 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 2 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 3 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 4 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 5 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 6 nM – alrededor de 10 nM, alrededor de 7 nM – alrededor de 10 nM, o alrededor de 8 nM – alrededor de 10 nM.
- [0116]** Al unirse al receptor NKG2D y al receptor CD16 en los linfocitos citolíticos naturales, y a un antígeno asociado a un tumor en las células cancerosas, las proteínas de unión multiespecíficas pueden acoplarse a más de un tipo de receptor activador de NK, y pueden bloquear la unión de los ligandos naturales a NKG2D. En determinadas modalidades, las

proteínas pueden agonizar los linfocitos NK en humanos. En algunas modalidades, las proteínas pueden agonizar los linfocitos NK en humanos y en otras especies tales como roedores y monos cynomolgus.

[0117] Al unirse al receptor NKG2D y al receptor CD16 en los linfocitos T citotóxicos, y a un antígeno asociado a un tumor en las células cancerosas, las proteínas de unión multiespecíficas pueden acoplarse a más de un tipo de receptor activador, y pueden bloquear la unión de los ligandos naturales a NKG2D. En determinadas modalidades, las proteínas pueden agonizar los linfocitos T citotóxicos en humanos. En algunas modalidades, las proteínas pueden agonizar los linfocitos T citotóxicos en humanos y en otras especies, tal como roedores y monos cynomolgus.

Sítio de unión a NKG2D

[0118] La Tabla 1 enumera las secuencias peptídicas de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, en combinación, pueden unirse a NKG2D. 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 cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se fusionan juntos para formar un scFv.

[0119] Los dominios de unión a NKG2D pueden variar en su afinidad de unión a NKG2D, sin embargo, pueden activar células de expresión de NKG2D, tales como linfocitos NK y linfocitos T citotóxicos.

[0120] A menos que se indique de otro modo, las secuencias CDR que se proporcionan en la Tabla 1 se determinan en Kabat.

Tabla 1		
Clones	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada	Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:1) CDR1 (SEQ ID NO:3) – GSFSFGYYWS CDR2 (SEQ ID NO:4) – EIDHSGSTNYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:5) –	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDFFATYY CQQYNSYPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2)

	ARARGPWSFDP	
ADI- 27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)
ADI- 27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYHSFYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:9)
ADI- 27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQSNSYYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:11)
ADI- 27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:12)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQYNSYPTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:13)
ADI- 28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWGFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:14)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPRDFSGS GSGTDFTLTISLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:15)
ADI- 28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTISVD	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS

	SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:16)	GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYGSFPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
ADI- 28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:18)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPDDFATYY CQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:19)
ADI- 29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:20)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYNSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:21)
ADI- 29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:22)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:23)
ADI- 29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:24)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:25)
ADI- 29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:26)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYGSFPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:27)
ADI- 29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS

	SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:28)	GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYQSFPFTGGGKVEIK (SEQ ID NO:29)
ADI- 29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:30)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYSSFPFTGGGKVEIK (SEQ ID NO:31)
ADI- 29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:32)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYESYFTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:33)
ADI- 29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:34)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYDSFITFGGGKVEIK (SEQ ID NO:35)
ADI- 29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:36)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CQQYQSYFTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:37)
ADI- 29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:38)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATY YCQQYHSFPFTGGGKVEIK (SEQ ID NO:39)
ADI- 29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVDT	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG

	SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:40)	SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYELYSYTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:41)
ADI- 29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTISVD SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:42)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISLQPDDEFATYY CQQYDTFITFGGGKVEIK (SEQ ID NO:43)
ADI- 27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCK ASGGTFSSYAIWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CARGDSSIRHAYYYYGMDVWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:44) CDR1 (SEQ ID NO:45) – GTFSSYAI (no Kabat) o SYAIS (SEQ ID NO:181) CDR2 (SEQ ID NO:46) – GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:47) – ARGDSSIRHAYYYYGMDV (no Kabat) o GDSSIRHAYYYYGMDV (SEQ ID NO:182)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQYYSTPITFGGG TKVEIK (SEQ ID NO:48) CDR1 (SEQ ID NO:49) – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (SEQ ID NO:50) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:51) – QQYYSTPIT
ADI- 29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSLTCTV SGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARGSDRFHPYFDYWQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52) CDR1 (SEQ ID NO:53) – GSISSSSYYWG (no Kabat) o SSSYYWG (SEQ ID NO:183) CDR2 (SEQ ID NO:54) –	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQFDTPPTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:56) CDR1 (SEQ ID NO:57) – RASQSVSRYLA CDR2 (SEQ ID NO:58) – DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:59) –

	SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (SEQ ID NO:55) – ARGSDRFHPYFDY (no Kabat) o GSDRFHPYFDY (SEQ ID NO:184)	QQFDTWPPT
ADI- 29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAV YGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEW IGEIDHSGSTNYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR ARGPWSFDPWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:60)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYKASSLESGVPSRFSGS GSGTEFTLTISSLQPDDFATYY CEQYDSYPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:61)
ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CARRGRKASGSFYFYYGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:62) CDR1 (SEQ ID NO:63) – GTFSSYAIS (no Kabat) o SYAIS (SEQ ID NO:181) CDR2 (SEQ ID NO:64) – GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:65) – ARRGRKASGSFYFYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKPLIYWASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQNDYSYPYTFGQG TKLEIK (SEQ ID NO:66) CDR1 (SEQ ID NO:67) – ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (SEQ ID NO:68) – WASTRES CDR3 (SEQ ID NO:69) – QNDYSYPYT
ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCK ASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVY YCARGAPNYGDTTHDYFYYMDVWG KGTTVTVSS (SEQ ID NO:70) CDR1 (SEQ ID NO:71) - YTFTSYMH (no Kabat) o SYMH (SEQ ID NO:185) CDR2 (SEQ ID NO:72) - IINPSGGSTSYAQKFQG	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:74) CDR1 (SEQ ID NO:75) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:76) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:77) - QQYDDWPFT

	CDR3 (SEQ ID NO:73) – ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (no Kabat) o GAPNYGDTTHDYYYMDV (SEQ ID NO:159)	
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLE WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCARDTGEYYDTDDHGMDVWG QGTTVTVSS (SEQ ID NO:78) CDR1 (SEQ ID NO:79) - YTFTGYMH (no Kabat) o GYYMH (SEQ ID NO:186) CDR2 (SEQ ID NO:80) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:81) – ARDTGEYYDTDDHGMDV (no Kabat) o DTGEYYDTDDHGMDV (SEQ ID NO:187)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:82) CDR1 (SEQ ID NO:83) - RASQSVSSNLA CDR2 (SEQ ID NO:84) - GASTRAT CDR3 (SEQ ID NO:85) - QQDDYWPPT
ADI- 27744 (A44)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDGGYYDSGAGDYWGQGLTVT SS (SEQ ID NO:86) CDR1 (SEQ ID NO:87) - FTFSSYAMS (no Kabat) o SYAMS (SEQ ID NO:188) CDR2 (SEQ ID NO:88) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:89) – AKDGGYYDSGAGDY (no Kabat) o DGGYYDSGAGDY (SEQ ID NO:189)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSYPRTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:90) CDR1 (SEQ ID NO:91) - RASQGIDSWLA CDR2 (SEQ ID NO:92) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:93) - QQGVSYPRT

ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPMGAAAGWFDPWGQGLVT VSS (SEQ ID NO:94) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:97) - ARGAPMGAAAGWFDP (no Kabat) o GAPMGAAAGWFDP (SEQ ID NO:191)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
ADI- 29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLE WMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVY YCAREGAGFAYGMDYYYMDVWG KGTTVTVSS (SEQ ID NO:102) CDR1 (SEQ ID NO:103) - YTFTSYMH (no Kabat) o SYMH (SEQ ID NO:185) CDR2 (SEQ ID NO:104) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (SEQ ID NO:105) - AREGAGFAYGMDYYYMDV o EGAGFAYGMDYYYMDV (SEQ ID NO:192)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:106) CDR1 (SEQ ID NO:107) - RASQSVSSYLA CDR2 (SEQ ID NO:108) - DASNRAT CDR3 (SEQ ID NO:109) - QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY

	RGAP<u>I</u>GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:169) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3: (SEQ ID NO:170) - ARGAP<u>I</u>GAAAGWFDP (no Kabat) o GAP<u>I</u>GAAAGWFDP (SEQ ID NO:193)	YCQQGVSPRPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>Q</u>GAAAGWFDPWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:171) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SSSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:172) - ARGAP<u>Q</u>GAAAGWFDP (no Kabat) o GAP<u>Q</u>GAAAGWFDP (SEQ ID NO:194)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSSSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP<u>L</u>GAAAGWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:173) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) -

	(SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:174) - ARGAPLGAAAGWFDP (no Kabat) o GAPLGAAAGWFDP (SEQ ID NO:195)	AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPFGAAAGWFDPWGQGTLLTV SS (SEQ ID NO:175) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:176) - ARGAPFGAAAGWFDP (no Kabat) o GAPFGAAAGWFDP (SEQ ID NO:196)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISWLA YQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPVGAAAGWFDPWGQGTLLTV SS (SEQ ID NO:177) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:178) -	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISWLA YQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFS SGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPRT

	ARGAPVGVGAAAGWFDP (no Kabat) o GAPVGVGAAAGWFDP (SEQ ID NO:197)	
A49- consens o	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEW VSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGAPXGAAAGWFDPWGQGTLLTV SS, donde X es M, L, I, V, Q, o F (SEQ ID NO:179) CDR1 (SEQ ID NO:95) - FTFSSYSMN (no Kabat) o SYSMN (SEQ ID NO:190) CDR2 (SEQ ID NO:96) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (SEQ ID NO:180) - ARGAPXGAAAGWFDP, donde X es M, L, I, V, Q, o F (no Kabat) o GAPXGAAAGWFDP, donde X es M, L, I, V, Q, o F (SEQ ID NO:160)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSPFRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:98) CDR1 (SEQ ID NO:99) - RASQGISSWLA CDR2 (SEQ ID NO:100) - AASSLQS CDR3 (SEQ ID NO:101) - QQGVSPFRT

[0121] De manera alternativa, un dominio variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO:110 puede emparejarse con un dominio variable de cadena ligera representado por la SEQ ID NO:111 para formar un sitio de unión al antígeno que puede unirse a NKG2D, tal como se ilustra en US 9.273.136.

SEQ ID NO:110

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYWGGQTTVTVSS
SEQ ID NO:111

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDLLPSGVSDRF
SGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

[0122] De manera alternativa, un dominio variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO:112 puede emparejarse con un dominio variable de cadena ligera representado por la SEQ ID NO:113 para formar un sitio de unión al antígeno que puede unirse a NKG2D, tal como se ilustra en US 7.879.985.

SEQ ID NO:112

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSANYNPS
 LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTVSS
 SEQ ID NO:113
 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF
 SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

Sitio de unión al antígeno asociado al tumor

[0123] La presente descripción proporciona un sitio de unión a BCMA, en el que el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera. En algunas modalidades, el sitio de unión a BCMA se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el sitio de unión al antígeno que se une a CD16 de las proteínas descritas en la presente mediante una bisagra. Las proteínas descritas en la presente pueden proporcionar acoplamiento monovalente o bivalente de BCMA, y tener uno o dos sitios de unión a BCMA. En algunas modalidades, las proteínas descritas en la presente tienen dos sitios de unión a BCMA, cada uno se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el sitio de unión al antígeno que se une a CD16 de las proteínas descritas en la presente mediante una bisagra.

[0124] La Tabla 2 enumera las secuencias de péptidos de los dominios variables de la cadena pesada y los dominios variables de la cadena ligera que, en combinación, pueden unirse a BCMA.

Tabla 2		
Clones	Secuencia de péptidos de dominio variable de cadena pesada	Secuencia de péptidos de dominio variable de cadena ligera
1 (US14/776,649)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYSPDYINWVRQAPG QGLEWMGWIFASGNSEYNQ KFTGRVTMTRDTSSSTAYMEL SSLRSEDVAVYFCASLYDYDW YFDVWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:114) CDR1(SEQ ID NO:115) - DYYIN CDR2 (SEQ ID NO:116) - WIYFASGNSEYNQKFTG CDR3 (SEQ ID NO:117) -	DIVMTQTPLSLSVTPGEPASISC KSSQSLVHSNGNTYLHWYLQK PGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDR FSGSGSGADFTLKISRVEAEDV GVYYCAETSHVPWTFGQGTKL EIK (SEQ ID NO:118) DIVMTQTPLSLSVTPGQPASIS CKSSQSLVHSNGNTYLHWYLQ KPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGIYYCSQSSIYPWTFGQGTKL

	LYDYDWYFDV	EIK (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/US15/64269)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTDYSINWVKRAPGK GLKWMGWINTETREPAYAYDF RGRFAFSLETSASTAYLQINNL KYEDTATYFCALDYSYAMDYW GQGTSVTVSS (SEQ ID NO:124) CDR1 (SEQ ID NO:125) - DYSIN CDR2 (SEQ ID NO:126) - WINTETREPAYAYDFR CDR3 (SEQ ID NO:127) - DYSYAMDY	DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISC RASESVTILGSHLIHWYQQKPG QPPTLLIQLASNVQTGVPARFS GSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAV YYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIK (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)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGGTFSNYWMHWVRQAP GQGLEWMGATYRGHSPTYN QKFKGRVTITADKSTSTAYMEL SSLRSEDVAVYYCARGAIYNGY DVLDNWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:132) CDR1 (SEQ ID NO:133) - NYWMH CDR2 (SEQ ID NO:134) - ATYRGHSPTYNQKFKG CDR3 (SEQ ID NO:135) - GAIYNGYDVLDN	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSNLHSGVPSRFGSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYRKLPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:136) CDR1 (SEQ ID NO:137) - SASQDISNYLN CDR2 (SEQ ID NO:138) - YTSNLHS CDR3 (SEQ ID NO:139) - QQYRKLPWT
4 (US20170051068)	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTC TVSGGSISSSSYFWGWIRQPP	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC GGNNIGSKSVHWYQQPPGQA

	GKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLK SRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARHDGATAGLFD YWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:140) CDR1: SSSYFWG (SEQ ID NO:141) CDR2: SIYYSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO:142) CDR3: HDGATAGLFDY (SEQ ID NO:143)	PVVVVYDDSDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAGDEAVYYCQVWD SSSDHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:144) CDR1: GGNIGSKSVH (SEQ ID NO:145) CDR2: DSDRPS (SEQ ID NO:146) CDR3: QVWDSSSDHV (SEQ ID NO:147)
5 (Mab42 (WO2017021450))	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDNAMGWVRQAP GKGLEWVSAISGPSSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVLGWFYD WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO:148) CDR1: DNAMG (SEQ ID NO:149) CDR2: <u>AISGPSSTYYADSVKG</u> (SEQ ID NO:150) CDR3: <u>VLGWFYD</u> (SEQ ID NO:151)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSDEYLSWYQQKPG QAPRLIHSASTRATGIPDRFS GSGSGTDFTLAISRLPEDFAV YYCQQYGYPPDFTFGQGTKVE IK (SEQ ID NO:152) CDR1: RASQSVSDEYLSW (SEQ ID NO:153) CDR2: HSASTRAT (SEQ ID NO:154) CDR3: QQYGYPPDFT (SEQ ID NO:155)

[0125] De manera alternativa, un dominio de unión a BCMA puede incluir un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera como se enumera a continuación en 83A10 y MAB42.

Dominio variable de cadena pesada 83A10 (SEQ ID NO:157):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGG

CDR1

CDR2

STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLGWFYDWGQGTTLVTVSS

CDR3

Dominio variable de cadena ligera 83A10 (SEQ ID NO:158):

EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI

CDR1

CDR2

PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPDFTFGQGGTKVEIK

CDR3

[0126] De manera alternativa, los sitios de unión al antígeno novedosos que pueden unirse a BCMA pueden identificarse mediante análisis para la unión a la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO:156.

SEQ ID NO:156

MLQMAGQCSQNEYFDSLLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILWTCLGL
SLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRTGDEILPRGLEITYVEECTC
EDCIKSKPKVDSDFPLPAMEEGATILVTTKNTDYCKSLPAALSATEIEKSISAR

[0127] Dentro del dominio Fc, la unión de CD16 está mediada por la región bisagra y el dominio CH2. Por ejemplo, dentro de la IgG1 humana, la interacción con el 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 (ver, *Sondermann et ál.*, *Nature*, 406 (6793):267-273). En función de los dominios conocidos, las mutaciones se pueden seleccionar para mejorar o reducir la afinidad de unión a CD16, como mediante el uso de bibliotecas con fagos o bibliotecas de ADNc con superficie de levadura, o se pueden diseñar en función de la estructura tridimensional conocida de la Interacción.

[0128] El ensamblaje de cadenas pesadas de anticuerpos heterodiméricos se puede lograr mediante la expresión de dos secuencias de cadenas pesadas de anticuerpos diferentes en la misma célula, lo que puede conducir al ensamblaje de homodímeros de cada cadena pesada de anticuerpos, así como al ensamblaje de heterodímeros. Promover el ensamblaje preferencial de heterodímeros puede lograrse al incorporar diferentes mutaciones en el dominio CH3 de cada región constante de cadena pesada del anticuerpo como se muestra en US13/494870, US16/028850, US11/533709, US12/875015, US13/289934, US14/773418, US12/811207, US13/866756, US14/647480 y US14/830336. Por ejemplo, se pueden hacer mutaciones en el dominio CH3 en base a la IgG1 humana e incorporar distintos pares de sustituciones de aminoácidos dentro de un primer polipéptido y un segundo polipéptido que permiten que estas dos cadenas se heterodimericen selectivamente entre sí. Las posiciones de las sustituciones de aminoácidos ilustradas a continuación están numeradas de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.

[0129] En un escenario, una sustitución de aminoácidos en el primer polipéptido reemplaza el aminoácido original con un aminoácido más grande, seleccionado de arginina (R),

fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W), y al menos un amino La sustitución de ácido en el segundo polipéptido reemplaza el (los) aminoácido (s) original (es) con uno o más aminoácidos más pequeños, elegidos entre alanina (A), serina (S), treonina (T) o valina (V), de modo que el más grande la sustitución de aminoácidos (una protuberancia) encaja en la superficie de las sustituciones de aminoácidos más pequeñas (una cavidad). Por ejemplo, un polipéptido puede incorporar una sustitución de T366W y el otro puede incorporar tres sustituciones que incluyen T366S, L368A, y Y407V.

[0130] Un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo de la invención puede acoplarse opcionalmente a una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a una región constante de anticuerpo, tal como una región constante de IgG que incluye dominios de bisagra, CH2 y CH3 con o sin dominio CH1. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la región constante es al menos 90 % idéntica a una región constante de anticuerpo humano, tal como una región constante de IgG1 humana, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 o 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 de anticuerpo de otro mamífero, tal como conejo, perro, gato, ratón o caballo. Se pueden 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. Las sustituciones de ejemplo 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.

[0131] 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 modalidades, las mutaciones que se pueden incorporar en el Ck de una región constante de IgG1 humana pueden estar en el aminoácido E123, F116, S176, V163, S174 y/o T164.

[0132] Las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes conjuntos de sustituciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido

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

[0133] De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes conjuntos de sustituciones mostrados en la Tabla 4.

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

[0134] De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos podrían seleccionarse de los siguientes conjuntos de sustituciones que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5		
	Primer polipéptido	Segundo polipéptido
Grupo 1	T366K/L351K	L351D/L368E
Grupo 2	T366K/L351K	L351D/Y349E

Grupo 3	T366K/L351K	L351D/Y349D
Grupo 4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
Grupo 5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
Grupo 6	E356K/D399K	K392D/K409D

[0135] De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos en cada cadena de polipéptidos podría seleccionarse de la Tabla 6.

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

[0136] De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos podría seleccionarse del siguiente conjunto de sustituciones en la Tabla 7, donde la o las posiciones que se indican en la columna Primer Polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido con carga negativa conocido, y la o las posiciones que se indican en la columna Segundo Polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido con carga positiva conocido.

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

[0137] De manera alternativa, al menos una sustitución de aminoácidos podría seleccionarse del siguiente conjunto en la Tabla 8, donde la o las posiciones que se indican en la columna Primer Polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido con carga positiva conocido y la o las posiciones que se indican en la columna Segundo Polipéptido se reemplazan por cualquier aminoácido con carga negativa conocido.

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

[0138] De manera alternativa, las sustituciones de aminoácidos pueden seleccionarse del siguiente conjunto en la Tabla 9.

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

- [0139]** De manera alternativa, o además, la estabilidad estructural de una proteína heteromultimérica puede incrementarse al introducir S354C en la primera o segunda cadena de polipéptidos, y Y349C en la cadena de polipéptidos opuesta, que forma un puente disulfuro artificial dentro de la interfaz de los dos polipéptidos.
- [0140]** 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 IgG1 en la posición T366, y 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.
- [0141]** 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 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.
- [0142]** 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, E357, S364, L368, K370, T394, D401, F405 y T411.
- [0143]** 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 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.
- [0144]** 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 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 IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en T366,

N390, K392, K409 y T411.

- [0145] 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, D399, S400 e Y407.
- [0146] 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, E357, D399 y F405.
- [0147] 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, K360, Q347 y K409.
- [0148] 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en D356, E357 y D399.
- [0149] 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 D356, E357 y D399, y 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en K370, K392, K409 y K439.
- [0150] 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, E356, T366 e D399 y 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 IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Y349, L351, L368, K392 y K409.

- [0151]** 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 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 la IgG1 en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L351, E356, T366 e D399.
- [0152]** 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 IgG1 por una sustitución S354C y 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 mediante una sustitución Y349C.
- [0153]** 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 IgG1 por una sustitución Y349C y 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 mediante una sustitución S354C.
- [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 IgG1 por sustituciones de K360E y K409W y 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 mediante sustituciones O347R, D399V y F405T.
- [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 IgG1 por sustituciones de O347R, D399V y F405T y 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 sustituciones de K360E y K409W.
- [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 IgG1 por sustituciones de T366W y 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 mediante sustituciones de T366S, T368A e Y407V.

[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 IgG1 por sustituciones de T366S, T368A y Y407V y 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 de T366W.

[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 IgG1 por sustituciones de T350V, L351Y, F405A, y Y407V y 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 sustituciones de T350V, T366L, K392L, y T394W.

[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 IgG1 por sustituciones de T350V, T366L, K392L, y T394W y 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 sustituciones de T350V, L351Y, F405A, e Y407V.

[0160] Las proteínas multiespecíficas que se describen anteriormente pueden elaborarse usando tecnología de ADN recombinante que un experto en la técnica conoce bien. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica la primera cadena pesada de inmunoglobulina puede clonarse en un primer vector de expresión; una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda cadena pesada de inmunoglobulina puede clonarse en un segundo vector de expresión; una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de inmunoglobulina puede clonarse en un tercer vector de expresión; y el primer, segundo y tercer vector de expresión pueden transfectarse de manera estable juntos en células hospedadoras para producir las proteínas multiméricas.

[0161] Para lograr el mayor rendimiento de la proteína multiespecífica, se pueden explorar diferentes proporciones del primer, segundo y tercer vector de expresión para determinar la proporción óptima para la transfección en las células hospedadoras. Luego de la transfección, pueden aislarse clones únicos para la generación de bancos de células mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como dilución limitada, ELISA, FACS, microscopía o Clonepix.

[0162] Los clones pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la ampliación de escala

del biorreactor y la expresión mantenida de la proteína multiespecífica. Las proteínas multiespecíficas pueden aislarse y purificarse mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen centrifugación, filtración en profundidad, lisis celular, homogeneización, congelación/descongelación, purificación de afinidad, filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio de interacción hidrofóbica y cromatografía de modo mixto.

II. Características de las proteínas multiespecíficas

[0163] Una proteína de unión multiespecífica de la presente descripción (por ejemplo, NKG2D-binding-F4-TriNKET-BCMA o NKG2D-binding-F3-TriNKET-BCMA), que incluye un scFV de unión a NKG2D y un dominio de unión a BCMA son más eficaces para reducir el crecimiento tumoral y matar células cancerosas. Por ejemplo, una proteína de unión multiespecífica de la presente descripción que se dirige a las células tumorales/cancerosas que expresan BCMA es más eficaz que un anticuerpo monoclonal anti-BCMA MAB42. Un TriNKET de la presente descripción NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA es más eficaz para promover la lisis celular mediada por NK de una línea celular de cáncer humano que expresa BCMA que un anticuerpo monoclonal anti-BCMA MAB42.

[0164] NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA muestra una unión débil a las células que expresan NKG2D. Sin embargo, las proteínas de unión multiespecíficas descritas en la presente que incluyen un dominio de unión a NKG2D (por ejemplo, NKG2D-binding-F4-TriNKET-BCMA o NKG2D-binding-F3-TriNKET-BCMA) exhiben una ventaja significativa en la potencia y la lisis máxima de las células objetivo en comparación con MAB42 anti-BCMA mAb.

[0165] Por consiguiente, en comparación con los anticuerpos monoclonales, las proteínas de unión multiespecíficas descritas en la presente (por ejemplo, NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA o NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA) son ventajosas en el tratamiento de cánceres que expresan BCMA.

III. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

[0166] Las proteínas descritas en la presente se pueden usar para activar los linfocitos T citotóxicos o los linfocitos citolíticos naturales. En algunas modalidades, se proporcionan en la presente métodos para activar un linfocito T citotóxico al exponer el linfocito T citotóxico a una proteína descrita en la presente. En algunas modalidades, se proporcionan en la presente métodos para activar un linfocito citolítico natural al exponer el linfocito citolítico natural a una proteína descrita en la presente.

[0167] Por consiguiente, en la presente se proporcionan métodos para mejorar la muerte de las células tumorales al exponer las células tumorales a una proteína descrita en la presente en presencia de linfocitos T citotóxicos o linfocitos citolíticos naturales. En algunas modalidades, en la presente se proporcionan métodos para mejorar la muerte de las células tumorales al

exponer las células tumorales a una proteína descrita en la presente en presencia de linfocitos T citotóxicos. En algunas modalidades, en la presente se proporcionan métodos para mejorar la muerte de las células tumorales al exponer las células tumorales a una proteína descrita en la presente en presencia de linfocitos citolíticos naturales.

[0168] También se proporcionan en la presente métodos para mejorar la respuesta inmunitaria contra células cancerosas que expresan BCMA en un sujeto mediante la administración de una proteína descrita en la presente o una formulación descrita en la presente al sujeto.

[0169] La invención proporciona métodos para tratar el cáncer mediante el uso de una proteína de unión multiespecífica que se describe en la presente y/o una composición farmacéutica que se describe en la presente. Los métodos pueden usarse para tratar una variedad de cánceres mediante la administración a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión multiespecífica que se describe en la presente. En algunas modalidades, los cánceres que se pueden tratar mediante proteínas descritas en la presente expresan BCMA.

[0170] El método terapéutico puede caracterizarse de acuerdo con el cáncer a tratar. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el cáncer es cáncer de mama, de ovario, de esófago, de vejiga o gástrico, carcinoma de conductos salivales, carcinomas de conductos salivales, adenocarcinoma de pulmón o formas agresivas de cáncer uterino, tal como el carcinoma de endometrio seroso uterino.

[0171] En ciertas otras modalidades, el cáncer que se va a tratar mediante una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente es cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer testicular o cáncer uterino. En aun otras modalidades, el cáncer es un 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 coroides, 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, 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, linfoma no Hodgkin, carcinoma de células pequeñas, cáncer oligodendrogial, 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, 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 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.

[0172] En determinadas otras modalidades, el cáncer a tratar por una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente es linfoma no-Hodgkin, tal como un linfoma de linfocitos B o un linfoma de linfocitos T. En determinadas modalidades, el linfoma no Hodgkin es un linfoma de linfocitos B, tal como un linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de linfocitos B mediastínico primario, linfoma folicular, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma de linfocitos B de la zona marginal extranodal, linfoma de linfocitos B de la zona marginal nodal, linfoma de linfocitos B de la zona marginal esplénica, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico, leucemia de células pilosas o linfoma primario del sistema nervioso central (SNC). En determinadas otras modalidades, el linfoma

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

[0173] En determinadas modalidades, el cáncer a ser tratado por una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente es linfoma de linfocitos B grandes (DLBCL). En determinadas modalidades, el DLBCL es DLBCL de linfocitos B centrales germinales (GCB). En determinadas modalidades, el DLBCL es DLBCL de linfocitos B activados (ABC).

[0174] En determinadas modalidades, el cáncer a tratar por una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente y/o una composición farmacéutica descrita en la presente es el mieloma múltiple, la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia linfocítica crónica, los linfomas de linfocitos B o la leucemia mieloide aguda. En determinadas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En determinadas modalidades, el cáncer es leucemia linfocítica crónica. En determinadas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda.

[0175] El cáncer a tratar puede caracterizarse de acuerdo con la presencia de un antígeno particular expresado en la superficie de la célula cancerosa. En determinadas modalidades, la célula cancerosa puede expresar uno o más de los siguientes además de BCMA: 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.

IV TERAPIA DE COMBINACIÓN

[0176] Otro aspecto de la invención proporciona una terapia de combinación. Una proteína de unión multiespecífica descrita en la presente puede usarse en combinación con agentes terapéuticos adicionales para tratar el cáncer.

[0177] Los agentes terapéuticos de ejemplo que se pueden usar como parte de una terapia de combinación en el tratamiento del cáncer incluyen, por ejemplo, radiación, mitomicina, tretinoína, ribomustina, gemcitabina, vincristina, etopósido, cladribina, mitobronitol, metotrexato, doxorubicina, carboquona, pentostatina, nitracrina, zinostatina, cetorelix, letrozol, raltitrexed, daunorrubicina, fadrozol, fotemustina, timalfasina, sobuzoxan, nedaplatino, citarabina, bicalutamida, vinorelbina, vesnarinona, aminoglutetimida, amsacrina, proglumida, acetato de eliptinio, ketanserina, doxifluridina, etretinato, isotretinoína, estreptozocina, nimustina, vindesina, flutamida, drogenilo, butocina, carmofur, razoxano, sizofilano, carboplatino, mitolactol, tegafur, ifosfamida, prednimustina, picibanilo, levamisol, tenipósido, improsulfano, enocitabina, lisurida, oximetolona, tamoxifeno, progesterona,

mepitiostano, epitioestanol, formestano, interferón alfa, interferón 2 alfa, interferón beta, interferón gamma (IFN-γ), factor estimulante de colonias 1, factor estimulante de colonias 2, denileucina difitox, interleucina-2, factor liberador de hormona luteinizante y variaciones de los agentes antes mencionados que pueden exhibir una unión diferencial a su receptor cognado, o una semivida en suero aumentada o disminuida.

[0178] Para determinados tipos de cáncer, por ejemplo mieloma múltiple, las terapias adicionales pueden ser una o más de lenalidomida, pomalidomida, talidomida, bortezomib, dexametasona, ciclofosfamida, doxorubicina, carfilzomib, iaxizomib, cisplatino, doxorubicina, etopósido, un anticuerpo anti-CD38 tal como daratumumab, panobinostat y elotuzumab, ya sea solo, en una de las combinaciones mencionadas anteriormente o en cualquier otra combinación.

[0179] Una clase adicional de agentes que pueden usarse como parte de una terapia combinada en el tratamiento del cáncer son los inhibidores del punto de control inmunitario. Inhibidores de puntos de control inmunitarios ilustrativos incluyen agentes que inhiben uno o más de (i) antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), (ii) proteína 1 de muerte celular programada (PD1), (iii) PDL1, (iv) LAG3, (v) B7-H3, (vi) B7-H4 y (vii) TIM3. El inhibidor de CTLA4 ipilimumab ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento del melanoma.

[0180] Aún otros agentes que pueden usarse como parte de una terapia de combinación en el tratamiento del cáncer son agentes de anticuerpos monoclonales que se dirigen a objetivos que no son puntos de control (por ejemplo, herceptina) y agentes no citotóxicos (por ejemplo, inhibidores de tirosina-quinasa).

[0181] Incluso otras categorías de agentes contra el cáncer incluyen, por ejemplo: (i) un inhibidor que se selecciona de un inhibidor de ALK, un inhibidor de ATR, un antagonista de A2A, un inhibidor de reparación por escisión de bases, un inhibidor de la tirosina quinasa Bcr-Abl, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton, un inhibidor de CDC7, un inhibidor de CHK1, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, un inhibidor de DNA-PK, un inhibidor de DNA-PK y mTOR, un inhibidor de DNMT1, un inhibidor de DNMT1 más 2-cloro-deoxiadenosina, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de la vía de señalización de Hedgehog, un inhibidor de IDO, un inhibidor de JAK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de MEK, un inhibidor de MELK, un inhibidor de MTH1, un inhibidor de PARP, un inhibidor de la fosfoinositida 3-quinasa, un inhibidor de PARP1 y DHODH, un inhibidor de proteasoma, un inhibidor de la Topoisomerasa-II, un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de VEGFR y un inhibidor de WEE1; (ii) un agonista de OX40, CD137, CD40, GITR, CD27, HVEM, TNFRSF25, o ICOS; y (iii) una citocina que se selecciona de IL-12, IL-15, GM-CSF y G-CSF.

[0182] Las proteínas de la invención también pueden usarse como un complemento a la extirpación quirúrgica de la lesión primaria.

[0183] La cantidad de proteína de unión multiespecífica y agente terapéutico adicional y el momento relativo de administración pueden seleccionarse para lograr un efecto terapéutico combinado deseado. Por ejemplo, cuando se administra una terapia de combinación a un paciente que necesita dicha administración, los agentes terapéuticos en la combinación, o una composición farmacéutica o composiciones que comprenden los agentes terapéuticos, pueden administrarse en cualquier orden tal como, por ejemplo, consecutivamente, conjuntamente, de manera conjunta, simultáneamente y similares. Además, por ejemplo, se puede administrar una proteína de unión multiespecífica durante un tiempo en que el (los) agente (s) terapéutico (s) adicional (es) ejercen su efecto profiláctico o terapéutico, o *viceversa*.

V. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0184] La presente descripción también presenta composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que se describe en la presente. La composición puede formularse para su uso en diversos sistemas de administración de fármacos. Uno o más excipientes o portadores fisiológicamente aceptables también pueden incluirse en la composición para una formulación adecuada. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa, 17ª edición 1985. Para una breve reseña de los métodos para la administración de fármacos véase, por ejemplo, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[0185] La formulación de administración intravenosa de fármacos de la presente divulgación puede estar contenida en una bolsa, un bolígrafo o una jeringa. En determinadas modalidades, la bolsa puede conectarse a un canal que comprende un tubo y/o una aguja. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación liofilizada o una formulación líquida. En determinadas modalidades, la formulación puede estar secada por congelación (liofilizada) y contenida en alrededor de 12-60 viales. En determinadas modalidades, la formulación puede estar secada por congelación y 45 mg de la formulación secada por congelación puede estar contenido en un vial. En determinadas modalidades, la formulación secada por congelación de alrededor de 40 mg a alrededor de 100 mg puede estar contenida en un vial. En determinadas modalidades, la formulación secada por congelación de 12, 27 o 45 viales se combinan para obtener una dosis terapéutica de la proteína en la formulación de fármaco intravenosa. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como alrededor de 250 mg/vial a alrededor de 1000 mg/vial. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como alrededor de 600 mg/vial. En determinadas modalidades, la formulación puede ser una formulación líquida y almacenarse como alrededor de 250 mg/vial.

- [0186] La proteína podría existir en una formulación farmacéutica acuosa líquida que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína en una solución amortiguadora que forma una formulación.
- [0187] Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse estérilmente. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso en la forma en que se encuentran o liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente se encontrará entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y más preferentemente entre 7 y 8, tal como 7 a 7,5. Las composiciones resultantes en forma sólida puede empacarse en unidades de dosis únicas múltiples, cada una contiene una cantidad fija del agente o agentes mencionados anteriormente. La composición en forma sólida también puede empacarse en un recipiente para una cantidad flexible.
- [0188] En determinadas modalidades, la presente divulgación proporciona una formulación con una vida útil extendida que incluye la proteína de la presente divulgación, en combinación con manitol, monohidrato de ácido cítrico, citrato de sodio, dihidrato de fosfato disódico, dihidrato de fosfato de dihidrógeno de sodio, cloruro de sodio, polisorbato 80, agua e hidróxido de sodio.
- [0189] En determinadas modalidades, se prepara una formulación acuosa que incluye la proteína de la presente divulgación en una solución amortiguada con pH. El amortiguador de esta invención puede tener un pH que varía de alrededor de 4 a alrededor de 8, por ejemplo, de alrededor de 4,5 a alrededor de 6,0, o de alrededor de 4,8 a alrededor de 5,5, o puede tener un pH de alrededor de 5,0 a alrededor de 5,2. También se pretende que los rangos intermedios a los pH mencionados anteriormente sean parte de la presente descripción. Por ejemplo, se pretende que se incluyan los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores. Ejemplos de tampones 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 tampones de ácidos orgánicos.
- [0190] En determinadas modalidades, la formulación incluye un sistema amortiguador que contiene citrato y fosfato para mantener el pH en un intervalo de alrededor de 4 a alrededor de 8. En determinadas modalidades, el rango de pH puede ser de alrededor de 4,5 a alrededor de 6,0, o de alrededor de un pH de 4,8 a alrededor de 5,5, o en un rango de pH de alrededor de 5,0 a alrededor de 5,2. En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio, fosfato de sodio dihidrato y/o , dihidrato de fosfato de dihidrógeno de sodio. En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye alrededor de 1,3 mg/mL de ácido cítrico (por ejemplo, 1,305 mg/mL), alrededor de 0,3

mg/mL de citrato de sodio (por ejemplo, 0,305 mg/mL), alrededor de 1,5 mg/mL de dihidrato de fosfato disódico (por ejemplo, 1,53 mg/mL), alrededor de 0,9 mg/mL de dihidrato de fosfato de dihidrógeno de sodio (por ejemplo, 0,86) y alrededor de 6,2 mg/mL de cloruro de sodio (por ejemplo, 6,165 mg/mL). En determinadas modalidades, el sistema amortiguador incluye 1-1,5 mg/mL de ácido cítrico, de 0,25 a 0,5 mg/mL de citrato de sodio, de 1,25 a 1,75 mg/mL de dihidrato de fosfato de sodio, de 0,7 a 1,1 mg/mL de dihidrato de fosfato de dihidrógeno de sodio y de 6,0 a 6,4 mg/mL de cloruro de sodio. En determinadas modalidades, el pH de la formulación se modifica con hidróxido de sodio.

[0191] Un poliol, que actúa como un tonicificador y puede estabilizar el anticuerpo, también puede incluirse en la formulación. El poliol se agrega a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. En determinadas modalidades, la formulación acuosa puede ser isotónica. La cantidad de poliol agregada también puede alterarse con respecto al peso molecular del poliol. Por ejemplo, se puede agregar una cantidad menor de un monosacárido (por ejemplo, manitol), en comparación con un disacárido (como la trehalosa). En determinadas modalidades, el poliol que puede utilizarse en la formulación como un agente de tonicidad es manitol. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 5 a alrededor de 20 mg/mL. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser alrededor de 7,5 a 15 mg/mL. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 10-14 mg/ml. En determinadas modalidades, la concentración de manitol puede ser de alrededor de 12 mg/ml. En determinadas modalidades, el poliol sorbitol puede incluirse en la formulación.

[0192] También se puede agregar 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 agregada es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. En determinadas modalidades, la formulación puede incluir un tensioactivo que es un polisorbato. En determinadas modalidades, la formulación puede contener el detergente polisorbato 80 o Tween 80. Tween 80 es un término utilizado para describir monooleato de sorbitán polioxietilenado (20) (ver Fiedler, Lexikon der Hfisstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4^a. ed., 1996). En determinadas modalidades, la formulación puede contener entre alrededor de 0,1 mg/mL y alrededor de 10 mg/mL de polisorbato 80 o entre alrededor de 0,5 mg/mL y alrededor de 5 mg/mL. En determinadas modalidades, alrededor de 0,1 % de polisorbato 80 puede agregarse en la formulación.

[0193] En modalidades, el producto proteico de la presente descripción se formula como una formulación líquida. La formulación líquida puede presentarse a una concentración de 10

mg/mL en el vial de tipo I 50R de la USP/Ph Eur cerrado con un tapón de caucho y sellado con un cierre de sello de aluminio corrugado. El tapón puede estar hecho de elastómero que cumple con la USP y Ph Eur. En determinadas modalidades, los viales pueden llenarse con 61,2 mL de la solución de producto proteico para permitir un volumen extraíble de 60 mL. En determinadas modalidades, la formulación líquida puede diluirse con solución salina al 0,9 %.

[0194] En determinadas modalidades, la formulación líquida de la divulgación puede prepararse como una solución de concentración de 10 mg/mL en combinación con un azúcar a niveles estabilizadores. En determinadas modalidades, la formulación líquida puede prepararse en un portador acuoso. En determinadas modalidades, puede agregarse un estabilizante en una cantidad no mayor que la que puede resultar en una viscosidad no deseable o no adecuada para administración intravenosa. En determinadas modalidades, el azúcar puede ser disacáridos, por ejemplo, sacarosa. En determinadas modalidades, la formulación líquida también puede incluir uno o más de un agente amortiguador, un tensioactivo y un conservante.

[0195] En determinadas modalidades, el pH de la formulación líquida puede establecerse mediante la adición de un ácido y/o base farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el ácido farmacéuticamente aceptable puede ser ácido clorhídrico. En determinadas modalidades, la base puede ser hidróxido de sodio.

[0196] Además de la agregación, la desamidación es una variante del producto común de péptidos y proteínas que puede ocurrir durante la fermentación, clarificación de cultivo/células, purificación, almacenamiento de la sustancia farmacológica/producto farmacológico y durante el análisis de muestras. La desamidación es la pérdida de NH_3 de una proteína que forma un intermedio de succinimida que puede sufrir hidrólisis. El intermedio de succinimida resulta en una disminución de la masa de 17 daltons del péptido original. La hidrólisis posterior resulta en un aumento de la masa de 18 daltons. El aislamiento del intermedio de succinimida es difícil debido a la inestabilidad en condiciones acuosas. Como tal, la desamidación es normalmente detectable como un aumento de masa de 1 dalton. La desamidación de una asparagina resulta en ácido aspártico o isoaspártico. Los parámetros que afectan la tasa de desamidación incluyen pH, temperatura, constante dieléctrica del solvente, fuerza iónica, secuencia primaria, conformación de polipéptido local y estructura terciaria. Los residuos de aminoácido adyacentes a Asn en la cadena de péptidos afectan las tasas de desamidación. Gly y Ser que siguen a una Asn en las secuencias de proteínas resulta en una mayor susceptibilidad a la desamidación.

[0197] En determinadas modalidades, la formulación líquida de la presente descripción puede conservarse en condiciones de pH y humedad para evitar la desaminación del producto proteico.

[0198] El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente

aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida. Los ejemplos de portadores incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0199] Se puede agregar opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente memoria para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de uso múltiple (dosis múltiple).

[0200] Las formulaciones intravenosas (IV) pueden ser la ruta de administración preferida en casos particulares, como cuando un paciente está en el hospital después del trasplante y recibe todos los medicamentos a través de la ruta IV. En determinadas modalidades, la formulación líquida se diluye con una solución de cloruro de sodio al 0.9 % antes de la administración. En determinadas modalidades, el producto farmacológico diluido para inyección es isotónico y adecuado para la administración mediante infusión intravenosa.

[0201] En determinadas modalidades, se pueden agregar componentes de sal o amortiguador en una cantidad de 10 mM - 200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y se originan de diversos ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguador de fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser glicinato, carbonato, amortiguadores de citrato, en cuyo caso, iones de sodio, potasio o amonio pueden funcionar como contraiones.

[0202] Se puede agregar opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente memoria para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de uso múltiple (dosis múltiple).

[0203] El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida. Los ejemplos de portadores incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución tamponada con pH (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0204] La proteína de la presente divulgación podría existir en una formulación liofilizada que incluye las proteínas y un lioprotector. El lioprotector puede ser azúcar, *por ejemplo*, disacáridos. En determinadas modalidades, el lioprotector puede ser sacarosa o maltosa. La formulación liofilizada también puede incluir uno o más de un agente amortiguador, un tensioactivo, un agente espesante y/o un conservante.

[0205] La cantidad de sacarosa o maltosa útil para la estabilización del producto farmacológico liofilizado puede estar en una relación en peso de al menos 1:2 proteína a

sacarosa o maltosa. En determinadas modalidades, la relación de peso de la proteína respecto a sacarosa o maltosa puede ser de 1:2 a 1:5.

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

[0207] Antes de la liofilización, el pH de la solución que contiene la proteína de la presente descripción puede ajustarse entre 6 a 8. En determinadas modalidades, el rango de pH para el producto farmacológico liofilizado puede ser de 7 a 8.

[0208] En determinadas modalidades, se pueden agregar componentes de sal o amortiguador en una cantidad de 10 mM - 200 mM. Las sales y/o amortiguadores son farmacéuticamente aceptables y se originan de diversos ácidos conocidos (inorgánicos y orgánicos) con metales o aminas "formadores de bases". En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser amortiguador de fosfato. En determinadas modalidades, el amortiguador puede ser glicinato, carbonato, amortiguadores de citrato, en cuyo caso, iones de sodio, potasio o amonio pueden funcionar como contraiones.

[0209] En determinadas modalidades, se puede agregar un "agente espesante". Un "agente espesante" es un compuesto que agrega masa a una mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierta). Los agentes espesantes de ejemplo incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol. Las formulaciones liofilizadas de la presente invención puede contener dichos agentes espesantes.

[0210] Se puede agregar opcionalmente un conservante a las formulaciones de la presente memoria para reducir la acción bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de uso múltiple (dosis múltiple).

[0211] En determinadas modalidades, el producto farmacológico liofilizado puede estar constituido con un vehículo acuoso. El portador acuoso de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, seguro y no tóxico para administración a un humano) y útil para la preparación de una formulación líquida, luego de la liofilización. Los diluyentes de ejemplo incluyen agua estéril para inyección (SWFI), agua bacterioestática para inyección (BWFI), una solución amortiguadora de pH (por ejemplo, una solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa.

[0212] En determinadas modalidades, el producto farmacológico liofilizado de la divulgación actual se reconstituye con agua estéril para inyección, USP (SWFI) o inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP. Durante la reconstitución, el polvo liofilizado se disuelve en una solución.

- [0213] En determinadas modalidades, el producto proteico liofilizado de la presente divulgación está constituido por alrededor de 4,5 mL de agua para inyección y diluido con solución salina al 0,9 % (solución de cloruro de sodio).
- [0214] Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente.
- [0215] La dosis específica puede ser una dosis uniforme para cada paciente, por ejemplo, 50-5000 mg de proteína. De manera alternativa, una dosis del paciente puede adecuarse al peso corporal aproximado o área de superficie del paciente. Otros factores para determinar la dosificación adecuada pueden incluir la enfermedad o afección a tratar o prevenir, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración y la edad, sexo y condición médica del paciente. Los expertos en la técnica, de forma rutinaria, realizan mayores refinamientos de los cálculos necesarios para determinar la dosificación adecuada para el tratamiento, especialmente ante la información de dosificación y ensayos descritos en la presente. La dosificación también se puede determinar a través del uso de ensayos conocidos para determinar dosificaciones utilizadas junto con datos dependientes de la dosis apropiados. Una dosificación del paciente individual puede ajustarse a medida que se monitorea el avance de la enfermedad. Los niveles en sangre de la construcción o complejo seleccionable en un paciente pueden medirse para ver si la dosificación debe ajustarse para alcanzar o mantener una concentración eficaz. Se puede utilizar la farmacogenómica para determinar qué construcciones y/o complejos seleccionables, y dosificaciones de estos, tienen más posibilidades de ser eficaces para un individuo dado (Schmitz et ál., *Clinica Chimica Acta* 308: 43-53, 2001; Steimer et ál., *Clinica Chimica Acta* 308: 33-41, 2001).
- [0216] En general, las dosificaciones según el peso corporal son de alrededor de 0,01 µg a alrededor de 100 mg por kg de peso corporal, tal como alrededor de 0,01 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 50 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,01 µg a alrededor de 0,1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 50 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 100 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, alrededor de 0,1 µg a alrededor de 1 µg/kg de peso corporal, alrededor de 1 µg

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

[0217] Las dosis pueden administrarse 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 calcular fácilmente las frecuencias de repetición para la dosificación en función de los tiempos de residencia y las concentraciones de la construcción o complejo seleccionables en fluidos o tejidos corporales. La administración de la presente invención podría ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, intracavitaria, mediante perfusión a través de un catéter o mediante inyección intralesional directa. Esta puede administrarse una vez o más veces por día, una vez o más veces por semana, una vez o más veces por mes y una vez o más veces por año.

[0218] La descripción anterior describe múltiples aspectos y modalidades de la invención. La solicitud de patente contempla de forma específica todas las combinaciones y cambios de los aspectos y las modalidades.

EJEMPLOS

[0219] La invención, descrita ahora en términos generales, se comprenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente a los efectos de ilustrar determinados aspectos y modalidades de la presente invención, y no se pretende que limiten la invención.

Ejemplo 1– Ensayo de citotoxicidad de linfocitos NK humanos primarios:

[0220] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de las capas leucocíticas de sangre periférica humana usando centrifugación en gradiente de densidad. Las PBMC aisladas se lavaron y se prepararon para el aislamiento de linfocitos NK. Los linfocitos NK se aislaron usando una técnica de selección negativa con perlas magnéticas, la pureza de los linfocitos NK aislados fue típicamente >90 % CD3⁻CD56⁺. Los linfocitos NK aislados se dejaron en reposo durante la noche, se usaron los linfocitos NK reposados al día siguiente en ensayos de citotoxicidad.

Ensayo de citotoxicidad de DELFIA:

[0221] Las líneas celulares de cáncer humano que expresan BCMA se recogieron del cultivo, las células se lavaron con HBS y se volvieron a suspender en medio de crecimiento en 10^6 /mL para etiquetar con reactivo BATDA (Perkin Elmer AD0116). Se siguieron las instrucciones del fabricante para el etiquetado de las células objetivo. Después del marcado las células se lavaron 3 veces con HBS y se volvieron a suspender en $0.5 - 1.0 \times 10^5$ /mL en medios de cultivo. Para preparar los pocillos del fondo se dejó a un lado una alícuota de las células marcadas y las células se centrifugaron fuera del medio. Se agregaron cuidadosamente 100 μ L de los medios a los pocillos por triplicado para evitar alterar las células precipitadas. Se agregaron 100 μ L células marcadas con BATDA a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los pocillos se guardaron para la liberación espontánea de las células objetivo, y los pocillos se prepararon para la lisis máxima de las células objetivo mediante la adición de Triton-X al 1 %. Los anticuerpos monoclonales o un TriNKET contra BCMA (NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA) se diluyeron en medios de cultivo, y se ańadieron 50 μ L de mAb diluido o TriNKET a cada pocillo. Los linfocitos NK reposados se recolectaron del cultivo, los linfocitos se lavaron y volvieron a suspender en 10^5 - 2.0×10^6 /mL en el medio de cultivo dependiendo de la relación E:T deseada. Se agregaron 50 μ L de linfocitos NK a cada pocillo de la placa para hacer un volumen de cultivo total de 200 μ L. La placa se incub3 a 37 ° C con 5 % de CO₂ durante 2-3 horas antes de desarrollar el ensayo.

[0222] Luego de cultivar durante 2- 3 horas, se removió la placa de la incubadora y las células se precipitaron 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, se agregaron 200 μ L de solución de europio a temperatura ambiente a cada pocillo. La placa se protegi3 de la luz y se incub3 en un agitador de placas a 250 rpm durante 15 minutos. La placa se ley3 utilizando instrumentos Victor 3 o SpectraMax i3X. El % de lisis específica se calcul3 de la siguiente manera: % de lisis específica = ((Liberación experimental - Liberación espontánea) / (Liberación máxima - Liberación espontánea)) * 100 %.

Ensayo de citotoxicidad a largo plazo basado en FACS:

[0223] Las líneas celulares de cáncer humano que expresan BCMA y transducidas de manera estable para expresar NucLight Green (Essen BioScience 4475) después de la selección de

puromicina se recogieron del cultivo centrifugado y se resuspendieron a 10^5 /mL en medio de cultivo. Se agregaron 100 μ l de células objetivo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA TriNKET se diluy3 en medio de cultivo y se a3adieron 50 μ l de cada uno a pocillos duplicados. NK humanos purificados reposaron durante la noche se cosecharon a partir del cultivo, se lavaron, y se resuspendieron a 4×10^5 /mL en medios de cultivo. Para una relaci3n c3lula efectora:c3lula objetivo (E:T) de 1:1, se a3adieron 50 μ l de linfocitos NK a todos los pocillos con la excepci3n de los controles de solo objetivo, que recibieron 100 μ l de medio de cultivo. Para el uso de PBMC reci3n procesados como efectores, se us3 una relaci3n E:T de 10:1. La placa se incub3 a 37 $^{\circ}$ C con CO₂ al 5 % durante 30 horas.

[0224] Despu3s del cultivo conjunto, las c3lulas se ti3eron, fijaron y analizaron mediante citometr3a de flujo. Las c3lulas objetivo restantes se detectaron con fuertes cambios en el canal FITC, con las c3lulas muertas excluidas con tinci3n de viabilidad. Se export3 el n3mero de eventos verdes y se calcul3 el % de madanza en comparaci3n con las muestras de control de solo objetivo. Se incluyeron perlas de conteo para asegurar que los vol3menes registrados fueran comparables.

Ejemplo 2 – Evaluaci3n de la uni3n de TriNKET a c3lulas NKG2D positivas

Uni3n de TriNKET en sangre entera humana

[0225] Se a3adieron 100 μ l de sangre entera humana heparinizada a cada tubo/pocillo. TriNKET marcado directamente (NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA) o mAb se agreg3 directamente a la sangre entera, tambi3n se agreg3 una mezcla de mAbs directamente conjugados para inmunofenotipado, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para el NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA o mAbs directamente marcado, despu3s de la incubaci3n se a3adieron 2 mL de 1x amortiguador de lisis/fijaci3n RBC a cada muestra. Las muestras se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron una vez despu3s de la lisis, luego se prepararon para el an3lisis.

[0226] La Figura 3 y la Figura 4 muestran la lisis de linfocitos NK humanos de l3neas celulares objetivo BCMA positivas en presencia de TriNKET anti-BCMA (NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA) o un anticuerpo monoclonal anti-BCMA, dentro de 2 horas. Las c3lulas KMS12-PE (Figura 3) y las c3lulas MM.1R (Figura 4), que tienen una expresi3n de BCMA baja y alta, respectivamente, se usaron como c3lulas objetivo. La NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA demostr3 valores de EC₅₀ subnanomolar contra las c3lulas KMS12-PE y MM.1R. En comparaci3n con un anticuerpo monoclonal anti-BCMA (MAB42), NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA proporcion3 una mayor lisis y potencia espec3ficas m3ximas contra ambas l3neas celulares (c3lulas KMS12-PE (Figura 3) y c3lulas MM.1R (Figura 4)).

Estabilización de superficie BCMA por TriNKET

- [0227] Las células KMS12-PE o MM.1R se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-BCMA (MAB42), TriNKET bivalente (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA) o TriNKET monovalente (A49-DB-TriNKET-BCMA). A49-DB-TriNKET-BCMA es un TriNKET en el que el primer sitio de unión al antígeno comprende un Fab que se une a NKG2D y el segundo sitio de unión al antígeno comprende un Fab que se une a BCMA, cada uno conectado a un dominio Fc, formando un anticuerpo bivalente (WO2018/148566).
- [0228] Para evaluar el BCMA de superficie total, se usó una concentración de saturación de 100 µg/mL, mientras que se seleccionaron 100 ng/mL para investigar la estabilización de la superficie de subsaturación. Cada muestra se dividió en tercios, con una alícuota colocada en hielo durante 20 minutos, a 37 °C durante 2 horas o 37 °C durante 24 horas. Después del período de incubación, las células se lavaron y se detectó TriNKET unido usando un anticuerpo secundario anti-IgG humano. Después de la tinción, las células se fijaron y almacenaron a 4 °C, todas las muestras se analizaron al final del estudio.

Las TriNKET estabilizan la superficie BCMA

- [0229] La Figura 5 muestra la tinción de BCMA de superficie en células KMS12-PE con anticuerpo monoclonal A49-DB-TriNKET-BCMA o BCMA (MAB42), después de la incubación durante el tiempo indicado. Tanto el mAb de BCMA como el TriNKET pudieron estabilizar BCMA de superficie rápidamente después de la incubación y mantener una mayor expresión durante un período de 24 horas. La Figura 6 muestra que se observó el mismo efecto en la línea celular MM.1R que expresa BCMA y es innatamente más alta.
- [0230] También se observó una mejora notable en la unión de células objetivo de BCMA con tiempos de incubación más largos a concentraciones subsaturadas de A49-DB-TriNKET-BCMA y mAb anti-BCMA (MAB42). La Figura 7 muestra la unión ávida proporcionada por el mAb anti-BCMA (MAB42) y el TriNKET bivalente (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA) facilitó un aumento rápido y sostenido en la unión a BCMA en células KMS12-PE mientras que con el TriNKET monovalente (A49-DB-TriNKET-BCMA) solo se observó una mejora limitada en la unión. La Figura 8 muestra un patrón similar en las células MM.1R.

Ejemplo 3: TriNKET bivalentes median una citotoxicidad superior a largo plazo

- [0231] La capacidad de las NK humanas purificadas para agotar las células KMS12-PE que expresan BCMA en presencia de un TriNKET bivalente (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA) se comparó con la de un anticuerpo monoclonal MAB42 anti-BCMA. La Figura 9 muestra el agotamiento mediado por NK reposado de células KMS12-PE por linfocitos NK humanos purificados (relación E:T de 1:1), tal como se detecta por citometría de flujo después de 20 horas. TriNKET bivalente BCMA (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA) dio como resultado una muerte más potente que el anticuerpo monoclonal o el TriNKET monovalente (A49-DB-TriNKET-BCMA). El uso de PBMC a una relación E:T de 10:1 en lugar de NK purificadas

produjo resultados similares (Figura 10). En comparación con cualquiera de los formatos TriNKET, el mAb anti-BCMA proporcionó una potencia máxima de destrucción y reducción con ambos tipos de células efectoras.

TriNKET BCMA posee una interacción de unión extremadamente débil con NKG2D en las células

[0232] Se utilizó la línea de linfocitos NK humanos KHYG-1 para evaluar la unión a NKG2D de TriNKET NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA. Las células KHYG-1 transducidas para expresar CD16-F158V se utilizaron para investigar la contribución de la unión de Fc CD16. Se diluyeron las TriNKET y se incubaron con células KHYG-1. Se detectó la unión del TriNKET mediante el uso de un anticuerpo secundario de IgG anti-humano conjugado con fluoróforo. Las células se analizaron por citometría de flujo y se informó la intensidad de fluorescencia media ("MFI").

[0233] Se investigó la capacidad de los TriNKET para unirse a las células que expresan NKG2D. Tal como se muestra en la Figura 11, prácticamente no se observó unión de TriNKET (NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA y NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA) a las células KHYG-1, que expresan NKG2D pero no CD16. En contraste, cuando el contexto de las células KHYG-1 se transdujo para expresar la variante de alta afinidad de CD16, el NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA pudo unir las células a un nivel MFI solo marginalmente más alto que el anticuerpo monoclonal anti-BCMA MAB42 (Figura 12). Sin embargo, el NKG2D-unión-F3-TriNKET-BCMA fue capaz de unirse a las células KHYG-1 que expresan CD16 en una MFI más alta (Figura 12). El hecho de que los TriNKET no se unieran a las células que expresan NKG2D fue más evidente por la incapacidad de los TriNKET de unir los linfocitos NK positivos NKG2D (Figura 13A), o los linfocitos T CD8+ (Figura 13B) en sangre entera. Los TriNKET pudieron unirse a los linfocitos B (Figura 13D), monocitos (Figura 13E) y granulocitos (Figura 13F) en sangre completa a un nivel comparable a la unión de control IgG1.

Ejemplo 4: TriNKET desencadenó la lisis de linfocitos T CD8+ de células tumorales BCMA +

Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T CD8+ humanos primarios:

[0234] *Generación de linfocitos T efectores CD8+ humanos primarios:* Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias de sangre periférica humana mediante el uso de centrifugación por gradiente de densidad. Las PBMC aisladas se estimularon con 1 µg/ml Concanavalina A (ConA) a 37 °C durante 18 horas. Luego se eliminó ConA y las células se cultivaron con 25 unidades/ml de IL-2 a 37 °C durante 4 días. Se purificaron los linfocitos T CD8+ usando una técnica de selección negativa con perlas magnéticas, luego se cultivaron en medio que contenía 10 ng/ml de IL-15 a 37 °C durante 6-13 días.

[0235] *Caracterización de linfocitos T efectores CD8+ humanos primarios:* Los linfocitos T efectores CD8+ humanos generados anteriormente se analizaron por citometría de flujo para

determinar la pureza de los linfocitos T CD8+, así como la expresión de NKG2D y CD16. Las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluoróforos contra CD3, CD8, NKG2D y CD16, luego se analizaron mediante citometría de flujo.

[0236] *Ensayo de citotoxicidad de linfocitos T efectores CD8+ a corto plazo DELFIA*: Células KMS12-PE de mieloma múltiple humano que expresan un objetivo de interés, BCMA, se cosecharon del cultivo. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento a 106/mL para etiquetar con reactivo BATDA (Perkin Elmer AD0116). Se siguieron las instrucciones del fabricante para el etiquetado de las células objetivo. Después del etiquetado, las células se lavaron tres veces con HBS y se volvieron a suspender en $0,5 \times 10^5$ /mL en medios de cultivo. Se agregaron 100 μ l células marcadas con BATDA a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Los pocillos se guardaron para la liberación espontánea de las células objetivo, y se prepararon para la lisis máxima de las células objetivo mediante la adición de Triton-X al 1 %. Los TriNKET y mAb se diluyeron en medios de cultivo y se añadieron a la placa a 50 μ l/pocillo. Los linfocitos T efectores CD8+ se recolectaron del cultivo, se lavaron y volvieron a suspender a 5×10^6 /mL en el medio de cultivo (relación E:T = 50:1). Luego se agregaron 50 μ l de linfocitos T CD8+ a cada pocillo de la placa para hacer un volumen de cultivo total de 200 μ l. La placa se incubó a 37 ° C con 5 % CO₂ durante 3,5 horas antes de desarrollar el ensayo. Luego de la incubación, se removió la placa de la incubadora y las células se precipitaron mediante centrifugación a 500 g durante 5 minutos. Luego se transfirieron 20 μ l de sobrenadante de cultivo a una microplaca limpia proporcionada por el fabricante, se agregaron 200 μ l de solución de europio a temperatura ambiente a cada pocillo. La placa se protegió de la luz y se incubó en un agitador de placas a 250 rpm durante 15 minutos. La placa se leyó utilizando instrumentos SpectraMax i3X.

[0237] El % de lisis específica se calculó de la siguiente manera: % de lisis específica = ((Liberación experimental - Liberación espontánea) / (Liberación máxima - Liberación espontánea)) * 100 %.

Caracterización de los linfocitos T efectores CD8+ utilizados en el ensayo de citotoxicidad

[0238] Tal como se muestra en la Figura 14, los linfocitos T efectores CD8+ generados con estimulación ConA y cultivados con IL-15 eran de alta pureza (> 99 % de células CD3+CD8+), y todas expresaban NKG2D pero no CD16.

NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA mejoró la lisis de las células KMS12-PE cuando se cultivaron de forma conjunta con los linfocitos T CD8+ activados

[0239] Citólisis de células KMS12-PE en el ensayo DELFIA: Se añadió 60 nM de NKG2D-unión-F4-TriNKET-BCMA, mAb anti-BCMA, o TriNKET irrelevante en cultivos de células objetivo KMS12-PE en presencia o ausencia de linfocitos T CD8+ estimuladas con IL-15 por el donante 1 (Figura 15A) y el donante 2 (Figura 15B). Los linfocitos T CD8+ activados

cultivados conjuntamente con células KMS12-PE en ausencia de TriNKET/mAb se incluyeron como destrucción de linfocitos T de fondo.

[0240] Las Figuras 15A-15B muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad DELFIA con linfocitos T efectores CD8+ primarios humanos derivados de dos donantes sanos y células objetivo KMS12-PE. Tal como se muestra, NKG2D-uni3n-F4-TriNKET-BCMA mejor3 la lisis de las células KMS12-PE cuando se cultivaron de forma conjunta con los linfocitos T CD8+ activados, pero no en ausencia de células efectoras. El mAb anti-BCMA parental o el TriNKET irrelevante no pudo mejorar la lisis por los linfocitos T CD8+ de ninguno de los donantes.

Ejemplo 5 - Los TriNKET estimularon la activaci3n de linfocitos NK

[0241] La activaci3n de cultivo conjunto de linfocitos NK purificados humanos: Se recogieron del cultivo l3neas celulares de c3ncer humano que expresaban BCMA, y las células se ajustaron a 1×10^6 células/mL. TriNKET/mAb se diluyeron en medios de cultivo. Los linfocitos NK en reposo se cosecharon del cultivo y se lavaron. Los linfocitos NK purificados se resuspendieron a 1×10^6 células/mL para E:T 1:1. Todos los cultivos conjuntos se complementaron con hIL-2, Brefeldin-A, monensina y anti-CD107a conjugado con fluor3foro y se incubaron durante 4 horas. La tinci3n intracelular de linfocitos NK vivos se logr3 despu3s de la fijaci3n usando amortiguador de permeabilizaci3n/lavado y anti IFN γ conjugado con fluor3foro.

[0242] Las Figuras 16A-16B muestran la activaci3n de linfocitos NK humanos en presencia de l3neas celulares objetivo BCMA positivas en presencia de TriNKET anti-BCMA o anticuerpo monoclonal en 4 horas. En la Figura 16A, se usaron células KMS12-PE (baja expresi3n de BCMA) como células objetivo. Tal como se muestra, TriNKET dirigido a BCMA medi3 la activaci3n m3s significativa de linfocitos NK humanos en el cultivo conjunto con células de mieloma KMS12-PE BCMA positivas que el mAb anti-BCMA. En la Figura 16B, se us3 H929 (alta expresi3n de BCMA) como célula objetivo. Tal como se muestra, TriNKET dirigido a BCMA medi3 la activaci3n m3s significativa de linfocitos NK humanos en el cultivo conjunto con células de mieloma H929 BCMA positivas que el mAb anti-BCMA. Por lo tanto, contra las células que expresan BCMA tanto altas como bajas, el F4-TriNKET desencaden3 un aumento en la desgranulaci3n y la producci3n de IFN γ con un valor subnanomolar de EC50. En comparaci3n con un anticuerpo monoclonal BCMA, el F4 TriNKET estimul3 una mayor proporci3n de linfocitos NK al m3ximo con una potencia mejorada contra ambas l3neas celulares.

MODALIDADES DE EJEMPLO

[0243] Modalidad 1: Una prote3na que comprende: (a) un primer sitio de uni3n a ant3genos que comprende un fragmento variable de cadena simple (scFv) que se une a NKG2D; dicho scFv que se une a NKG2D que comprende un dominio variable de cadena pesada y un

dominio variable de cadena ligera; (b) un segundo sitio de unión al antígeno que se une a otro antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA); y (c) un dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16.

- [0244] Modalidad 2: Una proteína de acuerdo con la modalidad 1, que comprende además un sitio de unión al antígeno adicional que se une a BCMA.
- [0245] Modalidad 3: La proteína de acuerdo con la modalidad 1 o 2, donde el segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA es un fragmento Fab.
- [0246] Modalidad 4: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-3, donde el segundo sitio de unión al antígeno y el adicional que se unen a BCMA son fragmentos Fab.
- [0247] Modalidad 5: La proteína de acuerdo con la modalidad 1 o 2, donde el segundo sitio de unión al antígeno y el adicional que se unen a BCMA son scFv, cada uno que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera.
- [0248] Modalidad 6: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-5, donde el dominio variable de cadena pesada del scFv que une NKG2D se ubica en el extremo N o el extremo C del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D.
- [0249] Modalidad 7: La proteína de acuerdo con la modalidad 6, donde el dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D se ubica en el extremo N del dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D.
- [0250] Modalidad 8: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-7, donde el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16 o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16.
- [0251] Modalidad 9: La proteína de acuerdo con la modalidad 8, donde el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [0252] Modalidad 10: La proteína de acuerdo con la modalidad 8, donde el scFv que se une a NKG2D se une al extremo C del dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16 o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante un enlazador flexible que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.
- [0253] Modalidad 11: La proteína de acuerdo con la modalidad 10, donde el extremo C del dominio Fc del anticuerpo está unido al extremo N del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D.
- [0254] Modalidad 12: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-11, donde dentro del scFv que se une a NKG2D, un puente de disulfuro se forma entre el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a

NKG2D.

- [0255] Modalidad 13: La proteína de acuerdo con la modalidad 12, donde el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de la cadena pesada y C100 del dominio variable de la cadena ligera.
- [0256] Modalidad 14: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-13, donde, dentro del scFv que se une a NKG2D, el dominio variable de cadena pesada está unido al dominio variable de la cadena ligera mediante un enlazador flexible.
- [0257] Modalidad 15: La proteína de acuerdo con la modalidad 14, donde el enlazador flexible comprende (GlyGlyGlyGlySer)_n (SEQ ID NO:198), donde n es un número entero entre 1-10.
- [0258] Modalidad 16: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 5 a 15, donde el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen cada uno al dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [0259] Modalidad 17: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 5 a 16, donde el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen al dominio Fc del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [0260] Modalidad 18: La proteína de acuerdo con la modalidad 16 o 17, donde un puente de disulfuro se forma entre el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno, el sitio de unión al antígeno adicional, o ambos.
- [0261] Modalidad 19: La proteína de acuerdo con la modalidad 18, donde el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de la cadena pesada y C100 del dominio variable de la cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno, el sitio de unión al antígeno adicional, o ambos.
- [0262] Modalidad 20: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 19, donde el dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D se ubica en el extremo N de un dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D, donde el dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D se une al dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D mediante un enlazador flexible que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:167, y scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc de anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
- [0263] Modalidad 21: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-20, donde el scFv que se une a NKG2D comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de la región determinante de complementariedad 1 (CDR1), la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) y la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 191, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que

comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 193, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 95, 96 y 97, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 188, 88 y 189, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente; (e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 104 y 192, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 107, 108 y 109, respectivamente; (f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 72 y 159, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 75, 76 y 77, respectivamente; (g) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 186, 80 y 187, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente; (h) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 194, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 195, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (j) un dominio

variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 196, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; (k) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 197, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; o (l) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 160, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.

- [0264]** Modalidad 22: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:94.
- [0265]** Modalidad 23: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98.
- [0266]** Modalidad 24: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:98.
- [0267]** Modalidad 25: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.
- [0268]** Modalidad 26: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.
- [0269]** Modalidad 27: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.
- [0270]** Modalidad 28: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[0271] Modalidad 29: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[0272] Modalidad 30: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[0273] Modalidad 31: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-21, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

[0274] Modalidad 32: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-31, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 149, 150 y 151, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente; (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 123, respectivamente; (c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 129, 130 y 131, respectivamente; (d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 133, 134 y 135, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, respectivamente; (e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 145, 146 y 147, respectivamente; o (f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:

120, 121 y 122, respectivamente.

- [0275]** Modalidad 33: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:152; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:152; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:152.
- [0276]** Modalidad 34: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:119; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:119; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:119.
- [0277]** Modalidad 35: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:128; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:128; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:128.
- [0278]** Modalidad 36: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:136; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:136; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:136.
- [0279]** Modalidad 37: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:144; (b) un dominio variable de

cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:144; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:144.

[0280] Modalidad 38: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-32, en donde el segundo sitio de unión a antígenos que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:118; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:118; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:118.

[0281] Modalidad 39: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende:

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 149, 150 y 151, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente;

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 123, respectivamente;

(c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 129, 130 y 131, respectivamente;

(d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 133, 134 y 135, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, respectivamente;

(e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias

CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 145, 146 y 147, respectivamente; o

(f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 122, respectivamente.

[0282] Modalidad 40: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:152; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:152; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:152.

[0283] Modalidad 41: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:119; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:119; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:119.

[0284] Modalidad 42: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:128; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:128; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:128.

[0285] Modalidad 43: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:136; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:136; o (c) un dominio variable de cadena

pesada idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:136.

[0286] Modalidad 44: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:144; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:144; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:144.

[0287] Modalidad 45: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 2-38, en donde el sitio de unión a antígenos adicional que se une a BCMA comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:118; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:118; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:118.

[0288] Modalidad 46: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-45, donde el dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16, es un dominio Fc de anticuerpo que comprende los dominios CH2 y bisagra de un anticuerpo de IgG1 humana.

[0289] Modalidad 47: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-45, donde el dominio Fc del anticuerpo o la parte de este suficiente para unirse a CD16, o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16, es un dominio Fc de anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo de IgG1 humana.

[0290] Modalidad 48: La proteína de acuerdo con la modalidad 46 o 47, donde el dominio Fc de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana, difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, T350, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439.

[0291] Modalidad 49: La proteína de acuerdo con la modalidad 48, donde el dominio Fc de anticuerpo es un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende las sustituciones Q347R, D399V y F405T.

[0292] Modalidad 50: La proteína de acuerdo con la modalidad 49, donde el dominio Fc de anticuerpo está unido al scFv que se une a NKG2D.

- [0293] Modalidad 51: La proteína de acuerdo con la modalidad 48, donde el dominio Fc es un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende las sustituciones K360E y K409W.
- [0294] Modalidad 52: La proteína de acuerdo con la modalidad 51, donde el dominio Fc está unido al segundo sitio de unión al antígeno.
- [0295] Modalidad 53: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [0296] Modalidad 54: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163, y la SEQ ID NO:165.
- [0297] Modalidad 55: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [0298] Modalidad 56: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [0299] Modalidad 57: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
- [0300] Modalidad 58: La proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-33 y 46-52 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162, que comprende además la SEQ ID NO:163 y SEQ ID NO:165.
- [0301] Modalidad 59: Una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-58, donde la proteína se une a NKG2D con una KD de 2 a 120 nM, medido por resonancia de plasmones superficiales.
- [0302] Modalidad 60: Una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-59, donde la proteína activa los linfocitos citolíticos naturales o los linfocitos T citotóxicos al unirse.
- [0303] Modalidad 61: Una formulación que comprende una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes y un portador farmacéuticamente aceptable.
- [0304] Modalidad 62: Una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60.
- [0305] Modalidad 63: Un método para potenciar la muerte celular en un tumor, que comprende exponer el tumor a una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60, en presencia de linfocitos citolíticos naturales o linfocitos T citotóxicos.
- [0306] Modalidad 64: Un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprende administrar una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60 o una formulación de acuerdo

con la modalidad 61 al sujeto.

[0307] Modalidad 65: El método de la modalidad 64, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas de linfocitos B, y leucemia mieloide aguda.

[0308] Modalidad 66: El método de la modalidad 64 o 65, donde el cáncer expresa BCMA.

[0309] Modalidad 67: Un método para agonizar un linfocito T citotóxico que comprende exponer el linfocito T citotóxico a una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60.

Modalidad 68: Un método para agonizar un linfocito citolítico natural que comprende exponer el linfocito citolítico natural a una proteína de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-60.

INCOPORACIÓN MEDIANTE REFERENCIA

[0310] La divulgación completa de todo documento de patente y artículo científico mencionado en la presente se incorpora mediante esta referencia para todos los fines.

EQUIVALENTES

[0311] La invención se puede presentar en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales. Por lo tanto, se considerará que las modalidades precedentes son ilustrativas en todos los sentidos y no limitan la invención descrita en la presente. Por lo tanto, el alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas y no por la descripción precedente, y se pretende que todos los cambios abarcados en el significado y espectro de equivalencia de las reivindicaciones estén comprendidos en estas.