

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1. Una construcción, que comprende:

un primer anticuerpo de dominio único, que tiene una secuencia de aminoácidos de una de
 5 SEQ ID NO: 14 y 15, que presenta especificidad y afinidad hacia el receptor de CD16a en la
 superficie de linfocitos citolíticos naturales (NK) sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-
 NA1) o CD32b; y

un segundo anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos que
 presenta especificidad y afinidad hacia un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria,
 10 un parásito o un virus,

donde el primer y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí con o sin un
 enlazador.

2. La construcción de la reivindicación 1, donde el antígeno se asocia a una célula cancerosa,
 y donde el antígeno se selecciona dentro del grupo que consiste en: HER2, HER1, HER3, HER4,
 15 EGFR, VEGFR, CD47, FGFR, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de tumor de vejiga
 (BTA), CA125, PDGFR, IGFR, CA15-3/CA27.29, CA19-9, CA27.29, ligando de muerte programada
 1 (PD-L1), PD-L2, CTL4, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD27, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40,
 CD48, CD52, B7-H3, familia MICA, familia RAET1/ULBP, HLA-E, TIM-3, LAG-3, supresor de Ig de
 dominio V de activación de linfocitos T (VISTA), HVEM, ICOS, 4-1BB, OX40, RANKL y GITR,
 20 marcadores epiteliales y mesenquimales de células tumorales en circulación, fosfatasa ácida
 prostática (PAP), antígeno prostático específico (PSA), péptidos solubles relacionados con la
 mesotelina (SMRP), receptor de somatostatina (SR), activador del plasminógeno urocinasa (uPA),
 inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), TCR (p. ej., moléculas de MHC de clase I o clase
 II), receptor A2a, antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), gonadotropina
 25 coriónica humana-beta, RAGE-1, MN-CAIX, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-
 2, M-CSF, próstata, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, prosteína,
 PSMA, antígeno tumoral-1 del carcinoma de próstata (PCTA-1), MART-1, MAGE, tirosinasa, TRP-
 1, TRP-2 BAGE, GAGE-1, GAGE- 2, RAGE, p15, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrinaB2, receptor
 de IGF-I, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, nm-23HI, TAG-
 30 72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, beta-catenina, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4,
 791Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 15-3CA 27.29BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43,
 CD68P1, CO-029, G250, Ga733EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-
 CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, proteína de unión TA-90Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C,
 TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

3. La construcción de la reivindicación 1, donde el antígeno está asociado a bacterias, y donde el antígeno se selecciona dentro del grupo que consiste en polisacáridos o antígenos peptídicos asociados a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*.
- 5 4. La construcción de la reivindicación 1, donde el antígeno está asociado a un virus, y donde el antígeno se selecciona dentro del grupo que consiste en antígenos del virus de Epstein Barr EBVA, antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV), antígenos de superficie del coronavirus, antígenos de superficie del virus de la influenza y antígenos de superficie del HIV.
- 10 5. La construcción de la reivindicación 1, donde el antígeno está asociado a un parásito, y donde el antígeno se selecciona dentro del grupo que consiste en antígenos asociados a malaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, esquistosomiasis, cisticercosis y estrongiloidiasis.
- 15 6. La construcción de la reivindicación 1, donde el primer anticuerpo de dominio único comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y el segundo anticuerpo de dominio único comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
7. La construcción de la reivindicación 1, donde el segundo anticuerpo de dominio único comprende una secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 3-11, y donde el segundo anticuerpo de dominio único presenta selectividad y afinidad hacia HER2 y facilita el reconocimiento de células cancerosas que expresan HER2
- 20 8. La construcción de la reivindicación 7, donde las células cancerosas que expresan HER2 son células de cáncer de ovario, células de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer de testículo, células de cáncer de útero o cualquier otra célula cancerosa con expresión de HER2.
- 25 9. La construcción de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del primer anticuerpo de dominio único muestra una afinidad alta hacia el receptor de CD16a de los linfocitos NK.
10. La construcción de la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos del segundo anticuerpo de dominio único muestra una afinidad alta hacia el antígeno asociado a la célula cancerosa, la bacteria, el parásito o el virus.
- 30 11. La construcción de la reivindicación 1, donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único están fusionados con un enlazador.
12. La construcción de la reivindicación 11, donde el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA).

13. La construcción de la reivindicación 1, que comprende además al menos un anticuerpo de dominio único adicional que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra afinidad y especificidad hacia otro epítipo en el mismo antígeno o en otro antígeno y fusionado con al menos uno del primer o segundo anticuerpo de dominio único con o sin enlazador.
- 5 14. La construcción de la reivindicación 13, donde el al menos un anticuerpo de dominio único adicional donde es el mismo tipo de anticuerpo que el primer anticuerpo de dominio único.
15. La construcción de la reivindicación 13, donde el al menos un anticuerpo de dominio único adicional donde es el mismo tipo de anticuerpo que el segundo anticuerpo de dominio único.
16. Un anticuerpo de dominio único, que comprende:
- 10 una secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 14 y 15, donde el anticuerpo de dominio único se une selectivamente y con afinidad alta a un receptor activador de CD16a en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK), sin reactividad cruzada con CD16b-NA1 o CD32b.
17. Un anticuerpo de dominio único, que comprende:
- 15 una secuencia de aminoácidos de al menos una de SEQ ID NO: 3-11, donde el anticuerpo de dominio único presenta selectividad y afinidad alta hacia HER2 y facilita el reconocimiento de células cancerosas que expresan HER2.
18. Un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto, el método comprende:
 administrar al sujeto una cantidad eficaz de la construcción de cualquiera de las
 20 reivindicaciones 6-8, donde la construcción activa los linfocitos NK en el sujeto para reconocer células cancerosas HER2 positivas objetivo en el sujeto.
19. Un método para realizar un ensayo de ELISA usando un anticuerpo de dominio único de la reivindicación 16 o la reivindicación 17 o una construcción de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, el método comprende:
- 25 inmovilizar una muestra que comprende uno o más antígenos en un soporte sólido, donde el uno o más antígenos se seleccionan de entre HER2 y CD16a;
 aplicar el anticuerpo de dominio único sobre una superficie de la muestra, donde el anticuerpo de dominio único actúa como un anticuerpo primario;
 aplicar un anticuerpo secundario sobre la superficie de la muestra, donde el anticuerpo
 30 secundario está enlazado a una enzima y está configurado para reconocer el anticuerpo de dominio único;
 añadir una sustancia que contiene un sustrato del sustrato de enzima a la muestra; y
 examinar la muestra para determinar si existe unión entre el anticuerpo de dominio único y el uno o más antígenos, donde si hubo unión por parte del anticuerpo de dominio único al uno o más

antígenos, la reacción posterior produce una señal detectable en la muestra.

20. Un método para realizar un ensayo de citometría de flujo usando un anticuerpo de dominio único de la reivindicación 17, el método comprende:

suspender una muestra que contiene células cancerosas y el anticuerpo de dominio único en un líquido;

aplicar, a la muestra, un anticuerpo secundario enlazado a una sonda fluorescente que puede unirse al anticuerpo de dominio único;

inyectar el fluido que comprende la muestra a un instrumento de citómetro de flujo;

analizar la muestra con un analizador de citometría de flujo; y

determinar si las células cancerosas son células cancerosas HER2+.

21. Un método de obtención de imágenes celulares que utiliza el anticuerpo de dominio único de la reivindicación 17, el método comprende:

fijar una muestra que comprende células cancerosas sospechosas en un portaobjetos;

aplicar el anticuerpo de dominio único a la muestra;

aplicar, a la muestra, un anticuerpo secundario enlazado a una sonda fluorescente que puede unirse al anticuerpo de dominio único;

examinar la muestra mediante un microscopio confocal o fluorescente para detectar la presencia o ausencia de expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas sospechosas.

22. El método de la reivindicación 21, donde el anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente es un anticuerpo antietiqueta his o un anticuerpo antietiqueta C-myc.

23. Un método de seguimiento y obtención de imágenes de células *in vivo* para el seguimiento de linfocitos NK alogénicas o autólogas en un sujeto usando un anticuerpo de dominio único de la reivindicación 16, el método comprende:

administrar al sujeto una sustancia de obtención de imágenes conjugada con el anticuerpo de dominio único;

realizar un método de obtención de imágenes de todo el cuerpo del sujeto para producir una imagen; e

identificar la ubicación anatómica de los linfocitos NK en la imagen.

24. El método de la reivindicación 23, donde el método de obtención de imágenes de cuerpo completo se selecciona dentro del grupo que consiste en: imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada (CT) y tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT).

25. Un método de fenotipado del cáncer *in vivo* para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto, que comprende:

administrar al sujeto una sustancia de obtención de imágenes conjugada con un anticuerpo de dominio único de la reivindicación 17;

realizar un método de obtención de imágenes de tumores del sujeto para producir una imagen; e

5 identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en la imagen.

26. El método de la reivindicación 25, donde el método de obtención de imágenes de tumores se selecciona dentro del grupo que consiste en: imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada (CT) y tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT).