

ANTICUERPOS DE AFINIDAD ALTA DE DOMINIO ÚNICO Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS

CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud se refiere a anticuerpos de dominio único y construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único, los cuales presentan afinidad y especificidad hacia el receptor activador de CD16a en linfocitos citolíticos naturales o antígenos en células cancerosas, bacterias, parásitos o virus.

ANTECEDENTES

Los receptores del fragmento cristalizante (Fc) y (FcγR) que se expresan en la superficie de los leucocitos se unen a los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) y son esenciales para la eficacia de muchos fármacos basados en anticuerpos. Los FcγR se dividen en receptores activadores (FcγRI/CD64, FcγRIIa/CD32a, FcγRIIc/CD32c, FcγRIIIa/CD16a y FcγRIIIb/CD16b) y receptores inhibidores (FcγRIIb/CD32b) (1). Estos receptores se unen a las IgG, aunque con diferentes afinidades (2). CD16a tiene afinidad baja y es el receptor principal para la región Fc de los anticuerpos monoclonales (mAb) y el único FcγR expresado en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK, por su sigla en inglés). CD16a en los linfocitos NK se une a las células recubiertas con anticuerpos (p. ej., células cancerosas), lo que desencadena una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por su sigla en inglés).

Debido a esta función, los linfocitos NK que expresan CD16a se están investigando actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer (p. ej., NCT04673617 y NCT03383978). Está bien establecido que, al aumentar la afinidad de unión de CD16a hacia la región Fc del anticuerpo, la citotoxicidad de los linfocitos NK y los resultados clínicos pueden mejorar significativamente (1, 3). Sin embargo, los anticuerpos actuales en esta área generalmente carecen de especificidad con respecto a CD16a, lo que puede obstaculizar la eficacia terapéutica y provocar toxicidades fuera del objetivo. Por ejemplo, se ha demostrado que los anticuerpos que también se unen al receptor activador de CD16b (expresado en neutrófilos) restringen la actividad de ADCC de los linfocitos NK contra las células cancerosas (4). Además, también se ha demostrado que la unión no específica de anticuerpos al receptor inhibidor de CD32b (expresado en linfocitos B) inhibe la maduración de los linfocitos B y la activación de los macrófagos (4, 5). CD32b también se expresa en un subconjunto de linfocitos T CD8⁺, lo que podría restringir la supervivencia de los linfocitos T al activar las vías de Caspasa 3 y 7 (6).

Los linfocitos NK que expresan CD16a también pueden estar involucrados en las respuestas inmunitarias a patógenos, tales como bacterias, parásitos o virus y, por lo tanto, las mejoras en la

actividad de ADCC de los linfocitos NK también pueden mejorar los resultados clínicos de los pacientes con infecciones bacterianas o virales.

La presente solicitud aborda los desafíos mencionados anteriormente y otros problemas relacionados con la activación y la reorientación de los linfocitos citolíticos naturales para dirigirse de manera eficaz a antígenos de superficie y lisar células objetivo, lo cual incluye células cancerosas, bacterias, parásitos o virus.

COMPENDIO

En un primer aspecto, se proporciona una construcción. La construcción comprende un primer anticuerpo de dominio único, que tiene una secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NO: 14 y 15, que presenta especificidad y afinidad hacia el receptor de CD16a en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK) sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b. La construcción también comprende 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, bacteria, parásito o virus, donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí con o sin un enlazador.

En otro aspecto, el antígeno está asociado a una célula cancerosa, y donde el antígeno se selecciona dentro del grupo que consiste en: HER2, HER1, HER3, HER4, EGFR, VEGFR, CD47, FGFR, antígeno carcinoembrionario (CEA, por su sigla en inglés), antígeno de tumor de vejiga (BTA, por su sigla en inglés), CA125, PDGFR, IGFR, CA15-3/CA27.29, CA19-9, CA27.29, ligando de muerte programada 1 (PD-L1, por su sigla en inglés), 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, por su sigla en inglés), HVEM, ICOS, 4-1BB, OX40, RANKL y GITR, marcadores epiteliales y mesenquimales de células tumorales en circulación, fosfatasa ácida prostática (PAP, por su sigla en inglés), antígeno prostático específico (PSA, por su sigla en inglés), péptidos solubles relacionados con la mesotelina (SMRP, por su sigla en inglés), receptor de somatostatina (SR), activador del plasminógeno urocinasa (uPA, por su sigla en inglés), 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 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, por su sigla en inglés), 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, pl85erbB2, pl80erbB-3, nm-23HI, TAG-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
 5 unión TA-90Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS.

En otro aspecto, 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 pneumonia*.

En otro aspecto, el antígeno está asociado a un virus, y donde el antígeno se selecciona
 10 dentro del grupo que consiste en antígenos del virus de Epstein Barr EBVA, antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV, por su sigla en inglés), antígenos de superficie del coronavirus, antígenos de superficie del virus de la influenza y antígenos de superficie del HIV.

En otro aspecto, 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
 15 Chagas, toxoplasmosis, esquistosomiasis, cisticercosis y estrongiloidiasis.

En otro aspecto, 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.

En otro aspecto, el segundo anticuerpo de dominio único comprende una secuencia de
 20 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.

En un aspecto adicional, las células cancerosas que expresan HER2 son células de cáncer de ovario, células de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, células de cáncer
 25 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.

En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos del primer anticuerpo de dominio único muestra una afinidad alta hacia el receptor de CD16a de los linfocitos NK.

En otro aspecto, la secuencia de aminoácidos del segundo anticuerpo de dominio único
 30 muestra una afinidad alta hacia el antígeno asociado a la célula cancerosa, la bacteria, el parásito o el virus.

En otro aspecto, el primer y segundo anticuerpo de dominio único se fusionan con un enlazador.

En un aspecto adicional, el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA,

por su sigla en inglés).

En otro aspecto, la construcción 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
5 segundo anticuerpo de dominio único con o sin enlazador.

En un aspecto adicional, el al menos un anticuerpo de dominio único adicional es el mismo tipo de anticuerpo que el primer anticuerpo de dominio único.

En un aspecto adicional, el al menos un anticuerpo de dominio único adicional es el mismo tipo de anticuerpo que el segundo anticuerpo de dominio único.

10 En un segundo aspecto, se proporciona un anticuerpo de dominio único. El anticuerpo de dominio único comprende 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.

15 En un tercer aspecto, se proporciona un anticuerpo de dominio único, donde el anticuerpo de dominio único comprende 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

20 En un cuarto aspecto, se proporciona un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto. En el método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de una construcción como se mencionó anteriormente, donde la construcción activa los linfocitos NK en el sujeto para reconocer las células cancerosas HER2 positivas objetivo en el sujeto.

25 En un quinto aspecto, se proporciona un método para realizar un ensayo ELISA usando un anticuerpo de dominio único o una construcción como se mencionó anteriormente. En el método, una muestra que comprende uno o más antígenos se inmoviliza sobre un soporte sólido, donde el uno o más antígenos se seleccionan de entre HER2 y CD16a. El anticuerpo de dominio único se aplica sobre una superficie de la muestra, donde el anticuerpo de dominio único actúa como un anticuerpo primario. Se aplica un anticuerpo secundario sobre la superficie de la muestra, donde el anticuerpo secundario está enlazado a una enzima y está configurado para reconocer el anticuerpo
30 de dominio único. Se añade a la muestra una sustancia que contiene un sustrato del sustrato de la enzima. Luego se examina 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.

En un sexto aspecto, se proporciona un método para realizar un ensayo de citometría de

flujo usando un anticuerpo de dominio único como se mencionó anteriormente. En el método, una muestra que contiene células cancerosas y el anticuerpo de dominio único se suspende en un líquido. Se aplica a la muestra un anticuerpo secundario enlazado a una sonda fluorescente que puede unirse al anticuerpo de dominio único. El fluido que comprende la muestra se inyecta en un instrumento de citómetro de flujo. Luego, la muestra se analiza con un analizador de citometría de flujo y luego se determina si las células cancerosas son células cancerosas HER2+.

En un séptimo aspecto, se proporciona un método de obtención de imágenes celulares usando un anticuerpo de dominio único como se mencionó anteriormente. En el método, una muestra que comprende células cancerosas sospechosas se fija en un portaobjetos y el anticuerpo de dominio único se aplica a la muestra. Se aplica a la muestra un anticuerpo secundario enlazado a una sonda fluorescente que puede unirse al anticuerpo de dominio único. Luego, la muestra se examina mediante un microscopio confocal o fluorescente para detectar la presencia o ausencia de expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas sospechosas. En otro aspecto, el anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente es un anticuerpo antietiqueta his o un anticuerpo antietiqueta C-myc.

En un octavo aspecto, se proporciona un método de obtención de imágenes y seguimiento de células *in vivo* para rastrear linfocitos NK alogénicos o autólogos en un sujeto usando un anticuerpo de dominio único como se mencionó anteriormente. En el método, se administra al sujeto una sustancia para obtención de imágenes conjugada con el anticuerpo de dominio único. Se realiza un método de obtención de imágenes de todo el cuerpo del sujeto para producir una imagen, y se identifica la ubicación anatómica de los linfocitos NK en la imagen. En otro aspecto, el método de obtención de imágenes de cuerpo completo se selecciona dentro del grupo que consiste en: imágenes por resonancia magnética (MRI, por su sigla en inglés), tomografía por emisión de positrones (PET, por su sigla en inglés), tomografía computarizada (CT, por su sigla en inglés) y tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT, por su sigla en inglés).

En un noveno aspecto, se proporciona un método de fenotipado del cáncer *in vivo* para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto. En el método, se administra al sujeto una sustancia para obtención de imágenes conjugada con un anticuerpo de dominio único como se mencionó anteriormente. Se realiza un método de obtención de imágenes de tumores del sujeto para producir una imagen, y las lesiones cancerosas que expresan HER2 se identifican en la imagen. En otro aspecto, 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).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1A. Esquemas de diferencias estructurales entre la IgG convencional y la IgG de camélido. El fragmento Fab de la IgG convencional consiste en cadena pesada y cadena ligera, al tiempo que la IgG de camélido está formada únicamente por una cadena pesada y carece de cadena ligera.

FIG. 1B-1D. FIG. 1B) Representación esquemática de VHH anti-CD16a y VHH antiantígeno unidos entre sí mediante un enlazador. FIG. 1C) Representación esquemática de BiKE que comprende VHH anti-CD16a y VHH antiantígeno, donde BiKE activa un linfocito NK para reconocer un objetivo (célula cancerosa, bacteria, virus). FIG. 1D) Representación esquemática de diversas configuraciones de uno o más VHH anti-CD16a unidos a uno o más VHH antiantígeno mediante un enlazador. Se pueden diseñar dos o más VHH anti-CD16a en conjunto para reconocer dos o más epítomos diferentes en el antígeno CD16a. De manera similar, se pueden diseñar dos o más VHH antiantígeno en conjunto para reconocer dos o más epítomos diferentes en el antígeno objetivo.

FIG. 2. Cronograma y método utilizados para inmunizar llama para la generación de VHH contra la proteína HER2.

FIG. 3A-3B. FIG. 3A) Análisis SDS-PAGE del antígeno HER2 purificado con peso molecular teórico de 72 633 Da. FIG. 3B). El nivel de IgG en suero de llama antes y después de la inmunización con la proteína HER2 medido mediante ELISA.

FIG. 4A-4B. FIG. 4A) Se aislaron PBMC utilizando el método de Ficoll-Paque. Luego, se extrajeron los ARN, se generó una biblioteca de ADNc, se amplificaron los genes y luego se clonaron en fagémidos pMECS-GG. Los fagémidos se utilizaron en la presentación en fagos y los candidatos cribados se utilizaron para infectar bacterias TG1. Se seleccionaron, cultivaron y lisaron las colonias y se retiraron los lisados. FIG. 4B) Los lisados se usaron luego en ELISA para detectar VHH con la afinidad más alta con respecto a HER2 y con unión insignificante a HER1, HER3 y HER4. Como controles se utilizó seroalbúmina bovina (BSA, por su sigla en inglés) y leche desnatada.

FIG. 5A. Análisis de SDS-PAGE de VHH anti-HER2 con etiqueta C-myc/his purificados.

FIG. 5B-5E. Los histogramas de citometría de flujo de células cancerosas HER2⁺ (BT474 y SKOV-3, FIG. 5B y 5C, respectivamente) y HER2⁻ (MDA-MB-231 y OVASC-1, FIG. 5D y 5E, respectivamente) etiquetadas con los VHH anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab. Se utilizaron los sitios de unión equimolares de los VHH purificados y los anticuerpos monoclonales anti-HER2 aprobados por la FDA (trastuzumab y pertuzumab) para medir la expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas HER2⁺. Se utilizaron células cancerosas HER2⁻ como controles negativos. Los datos de citometría de flujo mostraron que los VHH anti-HER2 seleccionados pueden

reconocer HER2 en la superficie de las células cancerosas HER2⁺ sin unirse a las células cancerosas HER2⁻.

FIG. 6A-6B. La evaluación de la toxicidad de los VHH anti-HER2 seleccionados, trastuzumab y pertuzumab para las células cancerosas HER2⁺ BT474 (FIG. 6A) y SKOV-3 (FIG. 6B). La toxicidad celular se midió mediante el ensayo de toxicidad celular WST-1 y los datos se muestran como media $\pm$ de.

FIG. 7A-7B. Determinación de la afinidad de VHH anti-HER2 y la cinética de unión mediante el uso de un interferómetro de biocapa. La KD (afinidad), K_{asoc} (constante de asociación) y K_{disoc} (constante de disociación) se determinaron utilizando el software Octet Data Analysis HT 11.1. Se seleccionaron clones E5 y A1 como posibles VHH de alto rendimiento.

FIG. 8A-8B. Imágenes de microscopía confocal de las células SKOV-3 tratadas con VHH anti-HER2 (clones E5 y A1) y obtenidas en diferentes momentos. El núcleo celular está etiquetado con DAPI (azul) y VHH con FITC (verde). Las imágenes superpuestas de la vista superior (corte medio de las pilas Z) muestran la unión a las células dependiente del tiempo, mientras que las imágenes de la vista lateral (borde) muestran la internalización de los VHH etiquetados con fluorescencia. Los resultados de este experimento mostraron que tanto los clones A1 (FIG. 8A) como E5 (FIG. 8B) comenzaron a internalizarse transcurrido un mínimo de 1 hora y el proceso de internalización se completó en 3-5 horas. Los datos publicados muestran que el trastuzumab se une e internaliza en las células cancerosas HER2⁺ en un mínimo de 4 horas.

FIG. 9A-9B. FIG. 9A) El análisis SDS-PAGE de rCD16a purificado (20 μ g). FIG. 9B) El nivel de IgG en suero de llama antes y después de la inmunización con la proteína rCD16a medido mediante ELISA.

FIG. 10A-10C. FIG. 10A: Se aislaron PBMC utilizando el método de Ficoll-Plaques. Luego, se extrajeron los ARN, se generó una biblioteca de ADNc, se amplificaron los genes y luego se clonaron en fagémidos pMECS-GG. Los fagémidos se utilizaron en la presentación en fagos y los candidatos cribados se utilizaron para infectar bacterias TG1. Se seleccionaron, cultivaron y lisaron las colonias y se retiraron los lisados. FIG. 10B: Evaluación de la especificidad de los VHH anti-CD16a de los extractos periplasmáticos hacia los antígenos CD16a y CD16b mediante ELISA. Como control se utilizó leche desnatada. FIG. 10C: Evaluación de la afinidad de unión de los VHH anti-CD16a en extracto periplasmático hacia el antígeno CD16a después de una dilución de 1280 veces.

FIG. 11. Evaluación de la especificidad de los VHH anti-CD16a C1 y E3 hacia el antígeno CD16a. Se usaron CD16b-NA1, CD16-NA2, CD32b y leche descremada como controles de antígeno, mientras que los mAb 3G8 (mAb anti-CD16a/b) y eBioCB16 (mAb anti-CD16a/b) disponibles comercialmente se usaron como controles de anticuerpos. Esta figura muestra que los

VHH anti-CD16a C1 y E3 se unen específicamente a CD16a sin reactividad cruzada con CD1b-NA1 y CD32b.

FIG. 12A-12E. Evaluación de la especificidad de los VHH anti-CD16a C1 y E3 hacia el antígeno CD16a mediante citometría de flujo usando linfocitos NK92 (CD16+) (FIG. 12A-12B), neutrófilos (FIG. 12C-12D) y linfocitos B (FIG. 12E). Se muestra el porcentaje positivo (PE+), el porcentaje negativo (PE⁻) y la intensidad de fluorescencia media (MFI, por su sigla en inglés) de las células etiquetadas. Esta figura muestra la especificidad de los VHH anti-CD16a C1 y E3 hacia el receptor de CD16a.

FIG. 13A-13E. Determinación de la afinidad de VHH anti-CD16a, la cinética de unión y la especificidad mediante el uso de un interferómetro de biocapa. La KD (afinidad), K_{asoc} (constante de asociación) y K_{disoc} (constante de disociación) se determinaron utilizando el software Octet Data Analysis HT 11.1. FIG. 13A-13B) Afinidad de unión de los clones C1 y E3 de anti-CD16a hacia el antígeno CD16a. FIG. 13C-13D) Afinidad de unión de los clones C1 y E3 de anti-CD16a hacia el antígeno CD16b-NA1. FIG. 13E) Mapeo de epítomos para VHH C1 y mAb (trastuzumab y pertuzumab) contra el antígeno CD16a. Esta figura muestra las afinidades altas de los VHH anti-CD16a hacia el antígeno CD16a con afinidades significativamente menores hacia CD16b-NA1. También muestra que VHH C1 se une a un epítipo diferente en CD16a que el trastuzumab y pertuzumab.

FIG. 14A-14C. FIG. 14A) La representación esquemática de VHH anti-HER2 (clon E5) fusionado con VHH anti-CD16a (clon C1) a través de un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA) para generar BiKE:HER2/CD16a. FIG. 14B) Análisis de SDS-PAGE de BiKE:HER2/CD16a expresado y purificado con un peso molecular teórico de 33,48 kDa. FIG. 14C) Gráfico de cromatografía de líquidos-espectroscopia de masas (LC-MS, por su sigla en inglés) de BiKE:HER2/CD16a con purificación (~1 mg/ml) que muestra el péptido como monómero sin la presencia de dímero o multímero.

FIG. 15A-15D. FIG. 15A) Comparación de la unión de VHH anti-CD16a con BiKE:HER2/CD16a mediante ELISA. FIG. 15B) Comparación de la unión de VHH anti-HER2 con BiKE:HER2/CD16a mediante ELISA. FIG. 15C) Comparación de la unión de VHH anti-CD16a con BiKE:HER2/CD16a mediante citometría de flujo en células NK92 (CD16+). FIG. 15D) Comparación de la unión de VHH anti-HER2 con BiKE:HER2/CD16a mediante citometría de flujo en células SKOV-3 (HER2+). Estas figuras muestran que la fusión de VHH anti-CD16a con VHH anti-HER2 no afectó su afinidad de unión hacia los antígenos objetivo.

FIG. 16A-16C. Afinidad de unión de BiKE E5C1 (BiKE:CD16a/HER2) hacia los antígenos CD16a, CD16b-NA1 y CD16b-NA2.

FIG. 17A-17D. FIG. 17A) Representación esquemática de la citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos. BiKE, trastuzumab y pertuzumab activan los linfocitos NK para reconocer las células cancerosas objetivo. FIG. 17B-17D) Células SKOV-3, BT474 y JIMT-1 tratadas con células haNK92 en diferentes relaciones E:T (linfocitos NK:células objetivo) en condiciones de células no adherentes.

5 La ADCC se midió después de tratar células cancerosas con células haNK92 en combinación con pertuzumab (Prz.), trastuzumab (Trz.) o BiKE. Esta figura muestra que BiKE indujo una ADCC significativamente mayor en comparación con Trz. o Prz.

FIG. 18A-18K. FIG. 18A-C) Medición de ADCC en condiciones adherentes en tres líneas de células cancerosas HER2+ usando células laNK92 en combinación con BiKE o trastuzumab en diferentes relaciones E:T, pero con una concentración de anticuerpo fija (100 nM). FIG. 18D-F) Medición de ADCC en tres líneas de células cancerosas HER2+ usando células laNK92 en combinación con BiKE o trastuzumab en diferentes concentraciones de anticuerpos, pero con una relación E:T fija de 4. FIG. 18G-J) Medición de IFN- γ , TNF- α , perforina y granzima B después de la incubación de células SKOV-3 con células laNK92 en presencia de BiKE o trastuzumab (Trz.) usando ELISA. FIG. 18K) Medición del cambio en la expresión de CD107a (desgranulación de laNK92) en diferentes concentraciones de anticuerpo usando citometría de flujo. Los datos se muestran como media $\pm$ de (*prueba t, $p < 0,05$, ns: no significativo).

FIG. 19A-19K. FIG. 19A-C) Medición de ADCC en condiciones adherentes en líneas de células cancerosas HER2+ usando células haNK92 en combinación con BiKE o trastuzumab en diferentes relaciones E:T, pero con una concentración de anticuerpo fija (100 nM). FIG. 19D-F) Medición de ADCC en líneas de células cancerosas HER2+ usando células haNK92 en combinación con BiKE o trastuzumab en diferentes concentraciones de anticuerpos, pero con una relación E:T de 4. FIG. 19G-J) Medición de IFN- γ , TNF- α , perforina y granzima B después de la incubación de células SKOV-3 con células haNK92 en presencia de BiKE o trastuzumab (Trz.) usando ELISA. FIG. 19K) Medición del cambio en la expresión de CD107a (desgranulación de haNK92) en diferentes concentraciones de anticuerpo usando citometría de flujo. Los datos se muestran como media $\pm$ de (*prueba t, $p < 0,05$).

FIG. 20: Medición de ADCC en condiciones adherentes en células SKOV-3 HER2+ incubadas con células laNK92 durante cuatro horas en presencia de BiKE (10 pM), trastuzumab (Trz.) (10 pM), pertuzumab (Prz.) (10 pM), trastuzumab (10 pM) + pertuzumab (10 pM), BiKE (10 pM) + pertuzumab (10 pM), BiKE (10 pM) + trastuzumab (10 pM), o ningún anticuerpo (es decir, SKOV3+ laNK92 solamente) (*prueba t, $p < 0,05$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

De acuerdo con una o más modalidades, la presente solicitud se refiere a anticuerpos de dominio único, construcciones que comprenden dos o más anticuerpos de dominio único; y métodos de destrucción de células cancerosas, métodos de destrucción de bacterias, métodos de destrucción de parásitos, métodos de destrucción de virus, métodos de obtención de imágenes y métodos de ensayo asociados que utilizan los anticuerpos de dominio único y las construcciones que comprenden dichos anticuerpos de dominio único.

DEFINICIONES

Para que la invención pueda entenderse más fácilmente, a continuación, se definen específicamente ciertos términos técnicos y científicos. A menos que se definan específicamente en otra parte del presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado que comúnmente entienden las personas expertas en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras como “un”, “una”, “el” y “la” incluyen sus correspondientes referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los linfocitos “citolíticos naturales” o “NK” son un tipo de linfocito citotóxico que es fundamental para el sistema inmunitario innato. Los linfocitos NK representan aproximadamente 5-20 % de todos los linfocitos en circulación en seres humanos.

“CD16” se refiere a un receptor de Fcγ de tipo III. En los seres humanos, existe en dos formas diferentes: FcγRIIIa (“CD16A”) y FcγRIIIb (“CD16B”). “CD16A” es un receptor activador de CD16A expresado en la superficie celular de linfocitos NK y macrófagos. CD16A puede desencadenar la actividad citotóxica de los linfocitos NK y los macrófagos. La afinidad de los anticuerpos con respecto a CD16A se correlaciona directamente con su capacidad de desencadenar la activación de los linfocitos NK, por lo que una mayor afinidad hacia CD16A reduce la dosis de anticuerpo necesaria para la activación. CD16B solo se expresa en neutrófilos.

“CD32”, que también se conoce como FcγRII o FCGR2, se refiere a una glicoproteína receptora de superficie que se puede encontrar en la superficie de una variedad de células inmunitarias. CD32B, uno de los tres subtipos principales de CD32, es un receptor de superficie inhibidor que forma parte de una gran población de correceptores de linfocitos B.

El término “HER2” o “receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano” se refiere a un oncogén que se sabe que está asociado al desarrollo y a la progresión de ciertos tipos agresivos de cánceres, tales como el cáncer de mama o el cáncer de ovario.

La expresión “etiqueta his”, “etiqueta his” o “etiqueta de polihistidina” se refiere a un motivo

de aminoácido en proteínas que generalmente consiste en seis o más residuos de histidina (His) en el extremo N o C de la proteína.

La expresión “agente para la obtención de imágenes” o “sustancia para la obtención de imágenes” generalmente se refiere a un compuesto o agente utilizado para aumentar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo durante imágenes médicas (por ejemplo, PET, MRI). La expresión “agente para la obtención de imágenes” o “sustancia para la obtención de imágenes” se puede utilizar indistintamente con la expresión “agente de contraste”.

Las expresiones “VHH”, “nanocuerpo” y “anticuerpo de dominio único” generalmente se refieren a un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico, que es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico.

La expresión “construcción de anticuerpo de dominio único” generalmente se refiere a una construcción que comprende dos o más anticuerpos de dominio único, donde uno o más anticuerpos de dominio único se unen a receptores activadores (es decir, CD16a) en linfocitos citolíticos naturales y uno o más anticuerpos de dominio único se unen a antígenos en células cancerosas, células bacterianas, parásitos o virus. La construcción de anticuerpo de dominio único puede ser biespecífica, trispecífica, tetraespecífica o multiespecífica.

La expresión “BiKE”, o “agente de unión de linfocitos citolíticos de carácter biespecífico”, generalmente se refiere a una construcción que comprende dos o más anticuerpos de dominio único, donde la construcción se une a receptores activadores (es decir, CD16a) en linfocitos citolíticos naturales y macrófagos y a antígenos en células cancerosas, células bacterianas, parásitos o virus.

El término “péptido”, como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos y proteínas de más de dos aminoácidos de longitud que también pueden incorporar moléculas que no son aminoácidos.

Las expresiones “sin unión” o “unión insignificante” o “sin reactividad cruzada con” se usan indistintamente en el presente documento y generalmente se refieren a una unión que es similar a la unión de fondo (control) y/o a una unión no significativa estadísticamente.

Las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, tóxica, alérgica, inflamatoria u otra reacción adversa cuando se administra a un animal o ser humano. Como se utiliza en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares que son farmacéuticamente aceptables tal como se usa la expresión en el presente documento y

preferiblemente inertes. El uso de esos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios a las composiciones. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los ingredientes activos, se contempla su uso en composiciones terapéuticas.

5 La expresión “cantidad eficaz de un agente para la obtención de imágenes” como se utiliza en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente para la obtención de imágenes suficiente para obtener una señal adecuada para la obtención de imágenes médicas de una parte del cuerpo. Los métodos para determinar la cantidad más eficaz del agente para la obtención de imágenes pueden variar según la composición utilizada, el propósito del uso y la célula objetivo de
10 la que se obtienen imágenes. Cuando los agentes para la obtención de imágenes descritos en el presente documento se administran conjuntamente con otro agente, la cantidad eficaz puede ser menor que cuando el agente se usa solo. Las personas expertas en la técnica pueden determinar fácilmente formulaciones y métodos adecuados para administrar los agentes para la obtención de imágenes.

15 Excepto cuando se indique lo contrario, los términos “sujeto” o “paciente” se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales de experimentación tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Por consiguiente, el término “sujeto” o “paciente” como se usa en el presente documento significa cualquier paciente o sujeto mamífero al que se pueden administrar los compuestos de la
20 divulgación. En un ejemplo de modalidad de la presente divulgación, para identificar pacientes sujetos para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la divulgación, se emplean métodos de cribado aceptados para determinar factores de riesgo asociados a una enfermedad o afección objetivo o sospechada o para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto. Estos métodos de cribado incluyen, por ejemplo, procesamientos convencionales para
25 determinar los factores de riesgo que pueden estar asociados a la enfermedad o afección objetivo o sospechada. Estos y otros métodos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes que necesitan terapia usando los métodos y compuestos de la presente divulgación.

 Las expresiones “tratar”, “que trata/n” o “tratamiento” de un estado, trastorno o afección incluyen: (a) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o afección
30 que se desarrolla en una persona que puede estar afligida o predispuesta al estado, trastorno o afección, pero que todavía no experimenta o muestra síntomas clínicos del estado, trastorno o afección; o (b) inhibir el estado, trastorno o afección, es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de esta (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos un síntoma clínico, signo o prueba de esta; o (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar la

regresión del estado, la enfermedad o la afección o al menos uno de sus síntomas o signos clínicos o subclínicos.

La expresión “alrededor de” o “aproximadamente” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por una persona experta en la técnica, que
5 dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición, es decir, el grado de precisión requerido para un propósito particular, tal como una formulación farmacéutica. Por ejemplo, “alrededor de” puede significar dentro de 1 o más de
10 1 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. Alternativamente, “alrededor de” puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferiblemente hasta el 10 %, más preferiblemente hasta el 5 % y aún más preferiblemente hasta el 1 % de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, la expresión puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe asumir que la expresión “alrededor de” significa dentro de un rango
15 de error aceptable para el valor particular.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “cantidad con eficacia terapéutica”, “dosis con eficacia terapéutica” y “cantidad eficaz” se refieren a una cantidad del compuesto y de las composiciones que es suficiente para lograr resultados beneficiosos o
20 deseados, que, cuando se administran solos o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, un tejido o un sujeto es eficaz para provocar una mejora mensurable en uno o más síntomas relacionados con la enfermedad o afección médica particular. Una dosis con eficacia terapéutica se refiere además a esa cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado al menos una mejora parcial de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica pertinente, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o
25 mejora de esas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis con eficacia terapéutica se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis con eficacia terapéutica se refiere a cantidades combinadas de ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea que se administren en combinación, en serie o en simultáneo. Una cantidad eficaz también puede dar como resultado
30 una mejora en una medida subjetiva en los casos en que se utilicen medidas subjetivas para evaluar la gravedad de la enfermedad.

Anticuerpos de dominio único

Los anticuerpos de dominio único, también conocidos como VHH (dominio variable de la

cadena pesada de un anticuerpo únicamente de cadena pesada) son fragmentos de anticuerpos que consisten en un único dominio de anticuerpo variable monomérico y carecen de una región de fragmento cristizable (Fc). Además de carecer de una región Fc, los VHH poseen características únicas que incluyen una especificidad alta con respecto a objetivo, afinidad en el intervalo (sub)nanomolar, estabilidad alta y facilidad de producción tanto en células de mamíferos como en células de *E. coli*. Estas características les permiten superar a los anticuerpos convencionales con fines radioterapéuticos y de obtención de imágenes.

La FIG. 1A muestra esquemas de diferencias estructurales entre una inmunoglobulina (IgG) convencional, un tipo de anticuerpo, y una IgG de camélido. El fragmento Fab de la IgG convencional consiste en cadena pesada y cadena ligera, al tiempo que la IgG de camélido consiste únicamente en una cadena pesada y carece de cadena ligera. Como se muestra en la FIG. 1A, este fragmento Fab únicamente con la cadena pesada en la IgG de camélido representa un anticuerpo de dominio único (VHH).

De acuerdo con una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único (VHH) de la presente solicitud se unen selectivamente con afinidad alta (intervalo subnanomolar) a a) receptores activadores de CD16a en la superficie de linfocitos citolíticos naturales (NK) o b) un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria, un parásito o un virus. La mayoría de los anticuerpos tienen valores de K_D en el intervalo micromolar bajo (10^{-6}) a nanomolar (10^{-7} a 10^{-9}). Generalmente se considera que los anticuerpos de afinidad alta están en el intervalo nanomolar bajo (10^{-9}), con los anticuerpos de afinidad muy alta en el intervalo picomolar (10^{-12}). Los valores de K_D generalmente corresponden a la concentración molar (sensibilidad) de la siguiente manera:

Valor de K_D	Concentración molar (sensibilidad)
De 10^{-4} a 10^{-6}	Micromolar (μM)
De 10^{-7} a 10^{-9}	Nanomolar (nM)
De 10^{-10} a 10^{-12}	Picomolar (pM)
De 10^{-13} a 10^{-15}	Femtomolar (fM)

De acuerdo con una o más modalidades de la presente solicitud, un anticuerpo con una afinidad de unión de 100 nM o menos se considera de "afinidad alta", un anticuerpo con una afinidad de unión de 100-500 nM se considera de "afinidad media" y un anticuerpo con una afinidad de unión de más de 500 nM se considera de "afinidad media-baja".

Por ejemplo, en una o más modalidades, la afinidad de unión de los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud hacia CD16a o un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria, un parásito o un virus es de hasta 50 nM. En al menos una modalidad, la afinidad de unión de los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud hacia CD16a o un antígeno asociado a

una célula cancerosa, una bacteria o un virus está en el intervalo de 750 pM a 850 pM, de 850 pM a 950 pM, de 950 pM a 1 nM, de 1 nM a 1,2 nM, de 1,2 nM a 1,4 nM, de 1,4 nM a 1,6 nM, de 1,6 nM a 1,8 nM, de 1,8 nM a 2,0 nM, de 2,0 nM a 2,2 nM, de 2,4 nM a 2,6 nM, de 2,6 nM a 2,8 nM o de 2,8 nM a 3,0 nM. En una o más modalidades, la afinidad de unión de los anticuerpos de dominio
5 único de la presente solicitud hacia CD16a o un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria, un parásito o un virus está en el intervalo de 3,0 nM a 5,0 nM, de 5,0 nM a 10 nM, de 10 nM a 15 nM, de 15 nM a 20 nM, de 20 nM a 25 nM, de 25 nM a 30 nM, de 30 nM a 35 nM, de 35 nM a 40 nM, de 40 nM a 45 nM o de 45 nM a 50 nM. Como tales, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud se consideran anticuerpos de “afinidad alta”.

10 La capacidad de unirse selectivamente a los receptores de CD16a de los linfocitos NK y/u otros antígenos de las células objetivo mejora la capacidad de los linfocitos NK para destruir células objetivo mediante un mecanismo conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). A través de la ADCC, los linfocitos NK pueden lisar activamente un objetivo (p. ej., una célula objetivo) a cuyos antígenos de superficie de la membrana se hayan unido anticuerpos
15 específicos.

La capacidad de unirse selectivamente a los receptores de CD16a de los macrófagos y/u otros antígenos de las células objetivo mejora la capacidad de los macrófagos para destruir células objetivo mediante un mecanismo conocido como fagocitosis dependiente de anticuerpos (ADCP, por su sigla en inglés). A través de la ADCP, los macrófagos pueden lisar activamente un objetivo (p.
20 ej., una célula objetivo) a cuyos antígenos de superficie de la membrana se hayan unido anticuerpos específicos.

Además, en una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud se unen selectivamente al receptor activador de CD16a en los linfocitos NK, pero no presentan reactividad cruzada con CD16b-NA1 ni CD32b. La especificidad de los anticuerpos de
25 dominio único hacia CD16a desempeña un papel importante a la hora de aumentar su eficacia terapéutica y reducir las toxicidades no deseadas. Por el contrario, se ha demostrado que otros anticuerpos que se unen al receptor activador de CD16b (expresado en neutrófilos) restringen la actividad ADCC de los linfocitos NK contra las células objetivo (p. ej., células cancerosas, bacterias, parásitos, virus). Además, también se ha demostrado que la unión no específica de anticuerpos al
30 receptor inhibitor de CD32b (expresado en linfocitos B) inhibe la maduración de los linfocitos B y la activación de los macrófagos. CD32b también se expresa en un subconjunto de linfocitos T CD8+ lo que podría restringir la supervivencia de los linfocitos T al activar las vías apoptóticas de Caspasa 3 y 7.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de afinidad alta y especificidad

alta de la presente solicitud, incluidos los anticuerpos de dominio único que se unen selectivamente a CD16a ("anti-CD16a VHH"), se pueden usar para citometría de flujo, ELISA. e imágenes de linfocitos NK que se infiltran en tumores.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud presentan afinidad de unión y especificidad hacia antígenos asociados a una célula cancerosa. Por ejemplo, en al menos un ejemplo de modalidad, el anticuerpo de dominio único muestra afinidad hacia HER2 (es decir, VHH anti-HER2) y facilita el reconocimiento de células cancerosas que expresan HER2. En una o más modalidades, la presente solicitud también divulga métodos para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto mediante un método de obtención de imágenes de tumores utilizando los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud. Los cánceres que expresan HER2 (cánceres HER2+) son agresivos y están asociados a metástasis. De esa manera, los anticuerpos anti-HER2 de dominio único y los métodos asociados de la presente solicitud proporcionan un enfoque confiable para identificar dichos cánceres y distinguirlos de las lesiones que no expresan HER2. Los VHH y los métodos de la presente solicitud se pueden usar para identificar tumores que expresen HER2, tales como tumores de ovario, y sus sitios metastásicos, tales como sitios metastásicos en los pulmones. Dado que la metástasis pulmonar es el segundo sitio metastásico más frecuente en el cáncer de ovario (p. ej., cáncer de ovario HER2+), un enfoque de diagnóstico cuantitativo confiable para la caracterización biológica de dichos sitios metastásicos es clínicamente valioso.

De acuerdo con una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud presentan afinidad de unión y especificidad hacia uno o más antígenos asociados a células cancerosas. Por ejemplo, en una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único pueden presentar afinidad y especificidad hacia antígenos relacionados con el cáncer que incluyen, entre otros, HER1 (anticuerpos anti-HER1), HER3 (anticuerpos anti-HER3), HER4 (anticuerpos anti-HER4), EGFR (anticuerpos anti-EGFR), VEGFR (anticuerpos anti-VEGFR), CD47 (anticuerpos anti-CD47), FGFR (anticuerpos anti-FGFR), antígeno carcinoembrionario (CEA) (anticuerpos anti-CEA), antígeno de tumor de vejiga (BTA) (anticuerpos anti-BTA), CA125 (anticuerpos anti-CA125), PDGFR (anticuerpos anti-PDGFR), IGFR (anticuerpos anti-IGFR), CA15-3/CA27.29 (anti-CA15-3/CA27.29), CA19-9 (anticuerpos anti-CA19-9), CA27.29 (anticuerpos anti-CA27.29), ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (anticuerpos anti-PD-L1), PD-L2 (anticuerpos anti-PD-L2) CTL4 (anticuerpos anti-CTL4), CD3 (anticuerpos anti-CD3), CD19 (anticuerpos anti-CD19), CD20 (anticuerpos anti-CD20), CD22 (anticuerpos anti-CD22), CD25 (anticuerpos anti-CD25), CD27 (anticuerpos anti-CD27), CD30 (anticuerpos anti-CD30), CD33 (anticuerpos anti-CD33), CD37 (anticuerpos anti-CD37), CD38 (anticuerpos anti-CD38), CD40 (anticuerpos anti-CD40), CD48 (anticuerpos anti-

CD48), CD52 (anticuerpos anti-CD52), B7-H3 (anticuerpos anti-B7-H3), TIM-3 (anticuerpos anti-TIM-3), LAG-3 (anticuerpos anti-LAG-3), supresor Ig dl dominio V de activación de linfocitos T (VISTA) (anticuerpos anti-VISTA), HVEM (anticuerpos anti-HVEM), ICOS (anticuerpos anti-ICOS), 4-1BB (anticuerpos anti-4-1BB), OX40 (anticuerpos anti-OX40), RANKL (anticuerpos anti-RANKL) y
 5 GTR (anticuerpos anti-GTR), marcadores epiteliales y mesenquimatosos de células tumorales en circulación, fosfatasa ácida prostática (PAP) (anticuerpos anti-PAP), antígeno prostático específico (PSA) (anticuerpos anti-PSA), péptidos relacionados con la mesotelina soluble (SMRP) (anticuerpos anti-SMRP), receptor de somatostatina (SR) (anticuerpos anti-SR), activador del plasminógeno urocinasa (uPA) (anticuerpos anti-uPA), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)
 10 (anticuerpos anti-PAI-1), TCR (p. ej., moléculas de MHC de clase I o clase II) (anticuerpos anti-MHC I/II), receptor de A2a (anticuerpos anti-A2aR), familia MICA (anticuerpos anti-MICA/B), familia RAET1/ULBP (anticuerpos anti-RAET1/ULBP), HLA-E (anticuerpos anti-HLA-E).

De acuerdo con una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud pueden presentar afinidad de unión y especificidad hacia otros antígenos asociados a
 15 células cancerosas que incluyen, entre otros, antígeno asociado a glioma, antígeno carcinoembrionario (CEA), beta-gonadotropina coriónica humana, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, prostetina, PSMA, antígeno tumoral-1 del carcinoma de próstata (PCTA-1), MART-1, MAGE, TRP-1, TRP-2 BAGE, GAGE-1, GAGE-2, RAGE, p15,
 20 ELF2M, neutrófilos elastasa, efrina B2, receptor de IGF-I, mesotelina, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; otros antígenos basados en proteínas incluyen TSP-180, pl85erbB2, pl80erbB-3, c-met, nm-23H1, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 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, Ga733, EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag,
 25 MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS 1, SDCCAG16, TA-90, proteína de unión a Mac-2\proteína asociada a ciclofilina C, TAAL6, TAG72, TLP y TPS, y receptor de SIRP-alfa.

De acuerdo con una o más modalidades, anticuerpos de dominio único de la presente solicitud presentan afinidad de unión y especificidad hacia uno o más antígenos asociados a bacterias. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio único pueden presentar afinidad y especificidad
 30 hacia antígenos asociados a bacterias que incluyen, entre otros, polisacáridos o antígenos peptídicos asociados a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, infección por STEC, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* y *Klebsiella pneumonia*, entre otras.

De acuerdo con una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente

solicitud presentan afinidad de unión y especificidad hacia uno o más antígenos asociados a un virus. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio único pueden presentar afinidad y especificidad hacia antígenos asociados a virus que incluyen, entre otros, 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, virus variólicos, fiebres hemorrágicas virales y antígenos de superficie del HIV, entre otros.

De acuerdo con una o más modalidades, anticuerpos de dominio único de la presente solicitud presentan afinidad de unión y especificidad hacia uno o más antígenos asociados a un parásito. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio único pueden presentar afinidad y especificidad hacia antígenos asociados a parásitos que incluyen, entre otros, antígenos asociados a la malaria, leishmaniasis, enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, esquistosomiasis, cisticercosis y estrongiloidiasis.

En una o más modalidades, estos anticuerpos de dominio único de afinidad alta y especificidad alta de la presente solicitud, incluidos los anticuerpos de dominio único que presentan especificidad y afinidad alta hacia un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria o un virus, (p. ej., VHH anti-HER2), se pueden utilizar para citometría de flujo, ELISA, inmunohistoquímica, imágenes celulares y métodos de fenotipado del cáncer ex vivo.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud pueden ser anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos. Por ejemplo, en una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único pueden humanizarse de la manera descrita en Cécile Vincke et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, núm. 5, págs. 3273-3284, 30 de enero de 2009, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. Más específicamente, en una o más modalidades, los aminoácidos de los anticuerpos de dominio único generalmente pueden humanizarse en las regiones marco 1, 3 y 4 (es decir, fuera de la región marco-2, posiciones 42, 49, 50 y 52), y tienen un efecto neutro o mínimo sobre las propiedades de los anticuerpos de dominio único. Por el contrario, ciertas sustituciones de humanización de la región marco-2, a saber, Phe-42 → Val y Gly/Ala-52 → Trp, pueden ser perjudiciales para la afinidad del antígeno debido a un reposicionamiento del bucle H3 y, por lo tanto, generalmente deben evitarse durante la humanización. Sin embargo, se observa que las sustituciones Glu-49 → Gly y Arg-50 → Leu en la región marco-2 en realidad pueden aumentar la estabilidad del dominio autónomo, pero pueden dar como resultado una solubilidad disminuida.

Además, en una o más modalidades, los aminoácidos de los VHH y las construcciones de la presente solicitud pueden sustituirse con aminoácidos homólogos (por ejemplo, aminoácidos polares y no polares, aminoácidos hidrófobos e hidrófilos, aminoácidos con carga positiva y negativa y

aminoácidos aromáticos) de manera que los VHH y las construcciones tengan una actividad biológica considerablemente equivalente. Además, para mantener una actividad biológica considerablemente equivalente, preferiblemente se conservan los aminoácidos dentro de los dominios funcionales de los VHH y las construcciones de la presente divulgación.

5

Anticuerpos de dominio único que muestran afinidad hacia CD16a (VHH anti-CD16a)

De acuerdo con al menos una modalidad de la presente solicitud, se proporcionan anticuerpos de dominio único (VHH) que presentan afinidad y especificidad alta hacia los receptores de CD16a con unión insignificante a los receptores de CD16b-NA1 y CD32b (denominados en el presente documento "VHH anti-CD16a"). En general, los VHH carecen de cadenas ligeras, carecen de una región Fc, poseen una especificidad alta con respecto al objetivo, afinidad en el intervalo (sub) nanomolar, estabilidad alta, tamaño pequeño (~15 kDa) e inmunogenicidad/toxicidad baja, y pueden producirse fácilmente tanto en células de mamíferos como de *E. coli* (7-9). En función de estas características particulares, de acuerdo con una o más modalidades, se produjeron ejemplos de VHH de la presente solicitud inmunizando una llama con proteína CD16a recombinante (rCD16a). Luego, mediante el uso de presentación en fagos, se aislaron clones de VHH con afinidad y especificidad alta hacia CD16a y sin reactividad cruzada con CD16b (por ejemplo, CD16b-NA1) o CD32b. Los VHH pueden producirse utilizando diversos materiales, como se ejemplificará en las secciones de ejemplos más adelante (ver la Sección 1 de Ejemplos).

En una o más modalidades, el anticuerpo de dominio único puede comprender al menos una de las secuencias de aminoácidos de C1 (SEQ ID NO: 14) y E3 (SEQ ID NO: 15), que presentan afinidad y especificidad hacia CD16a. Estas secuencias de aminoácidos se proporcionarán en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de los VHH anti-CD16a C1 (SEQ ID NO: 14) y E3 (SEQ ID NO: 15) con afinidad y especificidad hacia CD16a. La etiqueta-HA (YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 12)) y la etiqueta de histidina (HHHHHHHH (SEQ ID NO: 13)) se construyen en el extremo C de los VHH, respectivamente.

Código VHH	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4	Etiqueta
C1 (SEQ ID NO 14)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL RLSCAA	GRTFR LYR	MGWFR QAPGKE REFVGS	IKMIDG ST (SEQ ID NO: 31)	LYGDPVKGRFTI SRDNTKFMAYLQ MNSLKPEDTAVY YC	ASVSR VTGSY DS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta-HA + etiqueta His

	S							
E3 (SEQ ID NO 15)	QVQLQE SGGGLV QAGGSA RLSCAA S	GRTFR LYR	MGWFR QAPGKE REFVAS	IKMIDG SS	LFGDPVKGRFTI SRDNTKFMVYLQ MNSLKPEDTAVY YC	ASVSR NTGS WDS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta- HA + etiqueta His

En una o más modalidades, los VHH anti-CD16a de la presente solicitud comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a las regiones marco 1, 2, 3 y/o 4 de SEQ ID NO: 14-15 y siguen presentando las propiedades funcionales y de unión deseadas.

Anticuerpos de dominio único que muestran afinidad hacia células cancerosas, bacterias, parásitos o virus

De acuerdo con al menos una modalidad de la presente solicitud, se proporciona un anticuerpo de dominio único (VHH) que muestra afinidad y especificidad alta hacia antígenos asociados a células cancerosas, bacterias, parásitos o virus. En una o más modalidades, los VHH se pueden producir mediante inmunización de camélidos (por ejemplo, camellos, llamas) con el antígeno seleccionado asociado al tipo particular de célula cancerosa, bacteria, parásito o virus. Posteriormente, utilizando presentación en fagos, se pueden aislar clones de VHH con afinidad y especificidad alta hacia el antígeno seleccionado. La presentación en fagos se puede realizar, por ejemplo, como se describe en Els Pardon, et al., "A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology," Nat Protoc. Mar. de 2014;9(3):674-93. doi: 10.1038/nprot.2014.039, y Kristian Daniel Ralph Roth, et al., "Developing Recombinant Antibodies by Phage Display Against Infectious Diseases and Toxins for Diagnostics and Therapy," Front Cell Infect Microbiol. 7 de jul. de 2021;11:697876. doi: 10.3389/fcimb.2021.697876, que en ambos casos se incorporan en su totalidad mediante esta referencia. Los VHH pueden producirse utilizando diversos materiales, como se ejemplificará en las secciones de ejemplos más adelante (ver la Sección 1 de Ejemplos).

Anticuerpos de dominio único que muestran afinidad hacia HER2 (VHH anti-HER2)

De acuerdo con una o más modalidades, un anticuerpo de dominio único (VHH) de la presente solicitud puede unirse selectivamente a células cancerosas que expresan HER2

(denominadas en el presente documento “VHH anti-HER2”). Para abordar las necesidades no satisfechas actuales, se han producido anticuerpos de dominio único de la presente solicitud, que presentan una afinidad y especificidad alta hacia HER2 con una unión insignificante a HER1, HER3 y HER4. De acuerdo con una o más modalidades, los VHH anti-HER2 de la presente solicitud se produjeron inmunizando una llama con proteína HER2 recombinante. Luego, mediante el uso de presentación en fagos, se aislaron clones de VHH con afinidad y especificidad alta hacia HER2.

Por ejemplo, en una o más modalidades, los VHH anti-HER2 de la presente solicitud se pueden utilizar en métodos para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto mediante imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes por PET/CT, tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT) o cualquier otro trazador radiactivo o no radiactivo. Específicamente, de acuerdo con al menos una modalidad, un método para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto mediante MRI y/o PET/CT incluye las etapas de administrar una sustancia para la obtención de imágenes que comprende el VHH anti-HER2 a un sujeto, realizar una MRI y/o PET/CT del sujeto para producir una imagen (p. ej., imagen de MRI y/o PET/CT, e identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en la imagen de MRI y/o PET/CT. En los métodos en los que se utilizan imágenes por MRI, las células cancerosas que expresan HER2 se pueden identificar en la imagen por MRI usando un software de imágenes, tal como el software VivoQuant™ (ASPECT Imaging), por ejemplo. En los métodos en los que se utilizan imágenes por PET/SPECT/CT, las células cancerosas que expresan HER2 se pueden identificar en la imagen por PET/SPECT/CT usando un software de imágenes, tal como el software PMOD Albira Imaging System de Bruker, por ejemplo.

En una o más modalidades, los VHH anti-HER2 facilitan el reconocimiento de diversos tipos de células cancerosas que expresan HER2, incluidas las células cancerosas de ovario que expresan HER2 (por ejemplo, células cancerosas de ovario que expresan HER2 de una lesión metastásica), células de cáncer de mama, células de cáncer de cuello uterino células cancerosas, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer testicular, células de cáncer pulmonar, cáncer gástrico, cáncer de esófago y/o cáncer de útero.

En una o más modalidades, los VHH anti-HER2 se pueden producir usando diversos materiales, como se ejemplificará en las secciones de ejemplos más adelante (ver la Sección 2 de Ejemplos). En una o más modalidades, los VHH anti-HER2 pueden comprender al menos una de las secuencias de aminoácidos de la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de los VHH anti-HER2 seleccionados. Las etiquetas de c-myc (GSEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 1)) e histidina (HHHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2)) se construyen

en el extremo C de los VHH, respectivamente.

Códigos de VHH anti-HER2	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4	Etiqueta
A1 (SEQ ID NO 11)	QVQLQE SGGGLV QPGGSL RLSCAA S	GHTLS TYV	VAWFR QAPGK ERESV AA	IGWSSR SP	YYPDSVKGR FTISEDNTKN TVYLQMNSL KPDDTAVYY C	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
A3 (SEQ ID NO 3)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL RISCAA S	GRTS DLFP	VGWFR QAPGK EREIVA A	IRWSSG VI	GYGDPVKGR FTISTDNAKN TVYLQMNSL KPEDTAVYY C	AAGPRE STVTWN Y	WGQGTH VTVSS	Etiqueta C-Myc + His
C9 (SEQ ID NO 4)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL RLSCAA S	GRTV SRYS	MGWF RQAPG KEREF VAA	IAWFGG WP	YYADSVKGR FTISRDNKN TVYLQMNSL KPEDTAVYY C	AARQWA RTWDY	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
D6 (SEQ ID NO 5)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL TLSCAA S	GRTFS TYV	VGWFR QAPGK ERESV AA	IGWASN SP	YYADSVKGR FTISRDNKN TVYLQMKSLK PDDTAVYYC	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
E5 (SEQ ID NO 6)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL RLDCAA S	GRTLS SYV	VGWFR QAPGK EREVV AA	IGWSRT ST	FYTDSVKGR FTISRDNKN TVYLQMNSL KPGDTAVYY C	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
E9 (SEQ ID NO 7)	QVQLQE SGGGS VQAGG	GRTLS AYV	VGWFR QAPGR ERESV	IGWSTH SV	YYADSVKGR FTISRDNKN TVYLQMNSL	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His

Códigos de VHH anti-HER2	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4	Etiqueta
	SLKLSC AAS		AA		KPDDTAVYY C			
F2 (SEQ ID NO 8)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL KLSCAA S	GRTLS AYV	VGWFR QAPGR ERESV AA	IGWSTH SV	YYADSVKGR FTISRDNTE TVYLMNSL KPDDTAVYY C	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
F4 (SEQ ID NO 9)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL KLSCAA S	GRTLS AYV	VGWFR QAPGK ERESV AA	IGWSSR SP	YYPDSVKGR FTISEDNTKN TVYLMNSL KPDDTAVYY C	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
H7 (SEQ ID NO 10)	QVQLQE SGGGLV QAGGSL RLSCAA S	GHTLS TYV	VAWFR QAPGK ERESV AA	IGWSTR SP	YYADSVKGR FTISEDNTKN TVYLMNSL KPDDTAVYY C	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His

En una o más modalidades, los VHH anti-HER2 de la presente solicitud comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a las regiones marco 1, 2, 3 y/o 4 de SEQ ID NO: 3-11 y siguen presentando las propiedades funcionales y de unión deseadas.

Construcciones que tienen anticuerpos de dominio único

De acuerdo con una o más modalidades de la presente solicitud, se proporcionan construcciones que comprenden dos o más anticuerpos de dominio único de la presente solicitud.

En una o más modalidades, la construcción comprende un anticuerpo de dominio único anti-CD16a como se describió anteriormente ("VHH anti-CD16a") y al menos otro anticuerpo de dominio único ("VHH antiantígeno") que presenta afinidad y especificidad de unión hacia un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria, un parásito o un virus.

Más específicamente, en una o más modalidades, la construcción incluye un primer anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK) sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b. En una o más modalidades, la

5 secuencia de aminoácidos que muestra especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b es SEQ ID NO: 14. En al menos una modalidad, la secuencia de aminoácidos que muestra especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b es SEQ ID NO: 15. La construcción también incluye al menos un segundo anticuerpo de dominio único que tiene una

10 secuencia de aminoácidos que muestra afinidad y especificidad hacia un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria o un virus (VHH antiantígeno). El primer y el segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí con o sin un enlazador. En modalidades en las que los anticuerpos de dominio único se fusionan entre sí mediante un enlazador, el enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA). En la Tabla 3 más adelante se mostrará un

15 ejemplo de enlazador de HMA. En al menos una modalidad, el enlazador puede ser un enlazador basado en (GGGSG)_n (n=1, 2, 3, 4,...), (SEQ ID NO: 82) o cualquier otro enlazador flexible, semiflexible o rígido. En una o más modalidades en las que el primer anticuerpo de dominio único y los anticuerpos de dominio único adicionales se fusionan sin un enlazador, los anticuerpos de dominio único se pueden fusionar de forma recombinante en conjunto uno tras otro.

20 En las FIG. 1B-1C se muestra una representación esquemática de un ejemplo de construcción que presenta un primer anticuerpo de dominio único (VHH anti-CD16a) y un segundo anticuerpo de dominio único (VHH antiantígeno) unidos por un enlazador. Como se muestra en la FIG. 1C, el VHH anti-CD16a se une al receptor de CD16a en la superficie del linfocito NK y el VHH antiantígeno se une a un antígeno de superficie en la superficie del objetivo (por ejemplo, célula

25 cancerosa, célula bacteriana, virus). En consecuencia, la construcción no solo activa los linfocitos NK mediante la unión del VHH anti-CD16a, sino que también facilita el reconocimiento de las células cancerosas objetivo por parte de los linfocitos NK mediante la unión del VHH antiantígeno al antígeno de superficie del objetivo.

De acuerdo con una o más modalidades, la construcción puede comprender múltiples VHH

30 anti-CD16a fusionados entre sí y fusionados con otro anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra afinidad y especificidad hacia un antígeno asociado a una célula cancerosa, una bacteria o un virus. La construcción con múltiples VHH contra CD16a puede activar uno o más linfocitos NK mediante unión para facilitar el reconocimiento del objetivo (por ejemplo, célula cancerosa, célula bacteriana, parásito, virus) por parte de los linfocitos NK. La FIG.

1D es una representación esquemática de diversas configuraciones de construcciones con uno o más VHH anti-CD16a unidos a uno o más VHH antiantígeno mediante un enlazador.

En algunas modalidades, dos VHH idénticos se fusionan entre sí, uno de los cuales se fusiona además a un VHH diferente. En algunas modalidades, se fusionan dos VHH diferentes entre sí, que opcionalmente pueden fusionarse adicionalmente con uno o más VHH diferentes. Por ejemplo, en una construcción que comprende dos VHH fusionados, un VHH puede tener afinidad y especificidad con respecto a una primera célula inmunitaria, mientras que el otro tiene afinidad y especificidad con respecto a una segunda célula inmunitaria. Asimismo, en una o más modalidades, un primer VHH de una construcción puede tener afinidad y especificidad con respecto a una primera célula tumoral, mientras que un segundo VHH tiene afinidad y especificidad con respecto a una segunda célula tumoral. Además, en una o más modalidades, un primer VHH de una construcción puede tener afinidad y especificidad con respecto a una célula inmunitaria y un segundo VHH de una construcción puede tener afinidad y especificidad con respecto a un microorganismo, una célula infectada, una célula tumoral, una célula inflamada, una célula apoptótica o una célula extraña, sin limitación. En una o más modalidades, como se ejemplifica en la FIG. 1D, uno o más VHH anti-CD16a pueden unirse a uno o más VHH que tienen afinidad y especificidad con respecto a un microorganismo, una célula infectada, una célula tumoral, una célula inflamada, una célula apoptótica o una célula extraña ("VHH antiantígeno"), donde el uno o más antiantígenos son un VHH, scFv, mAb o cualquier otra forma de anticuerpo. También como se ejemplifica en la FIG. 1D, en una o más modalidades, dos o más VHH anti-CD16a pueden diseñarse en conjunto para reconocer dos o más epítomos diferentes en el antígeno CD16a. De manera similar, se pueden diseñar dos o más VHH antiantígeno en conjunto para reconocer dos o más epítomos diferentes en un antígeno objetivo. Los VHH pueden ser específicos para los mismos o diferentes antígenos relacionados con un microorganismo, una célula infectada, una célula tumoral, una célula inflamada, una célula apoptótica o una célula extraña.

En una o más modalidades, las construcciones de VHH se pueden producir de una manera como se describe en Ulrich Brinkmann & Roland E. Kontermann (2017), "The making of bispecific antibodies," mAbs, 9:2, págs. 182-212, DOI: 10.1080/19420862.2016.1268307, que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. Por ejemplo, en una o más modalidades, los dominios de dos o más anticuerpos de dominio único pueden fusionarse para formar la molécula de construcción, que puede ser una molécula bivalente, trivalente o multivalente con una o más especificidades (es decir, monoespecífica, biespecífica, triespecífica, tetraespecífica, multiespecífica). Los términos "bivalente", "trivalente", "multivalente" denotan la presencia de dos sitios de unión, tres sitios de unión y múltiples sitios de unión, respectivamente, en una molécula

de anticuerpo de unión a antígeno.

Por ejemplo, en una o más modalidades, se pueden fusionar dos dominios VHH con una secuencia bisagra larga derivada de la bisagra superior de una IgG2a de llama para formar una construcción biespecífica. Se puede utilizar un enlazador flexible, tal como un enlazador de nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulina de tiburón (VNAR) para combinar los dos dominios variables. En un ejemplo de modalidad, el enlazador puede comprender una bisagra de IgNAR de tiburón natural (PGVQPSP (SEQ ID NO: 16)) seguida de una secuencia flexible GGGSG (SEQ ID NO: 17). Otros posibles enlazadores incluyen enlazadores flexibles (G3S)₄, enlazadores flexibles GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 18), un enlazador de HMA (ver la Tabla 3 a continuación), un enlazador basado en (GGGSG)_n (n=1, 2, 3,...) (GGGSG (SEQ ID NO: 19), o cualquier otro enlazador flexible, semiflexible o rígido.

En al menos una modalidad, la construcción puede comprender dos VHH —un VHH anti-CD16a y un VHH anti-HER2— fusionados entre sí con o sin un enlazador para crear un agente de unión de linfocitos citolíticos de carácter biespecífico (“BiKE”, por sus siglas en inglés, específicamente un “BiKE:HER2/CD16a”) con especificidad y afinidad hacia el receptor de CD16a y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b. De esa manera, el BiKE:HER2/CD16a se une al receptor de CD16a en la superficie del linfocito NK y a las células cancerosas que expresan HER2, activando así los linfocitos NK para facilitar el reconocimiento de las células cancerosas HER2+ objetivo por parte de los linfocitos NK.

Si bien los ejemplos en la presente solicitud que utilizan un “BiKE” generalmente se refieren a construcciones BiKE:HER2/CD16a, debe entenderse que, de acuerdo con otras modalidades de la presente solicitud, una construcción de “BiKE” generalmente puede incluir un VHH anti-CD16a y otro anticuerpo de dominio único (VHH antiantígeno) que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra afinidad y especificidad hacia un antígeno diferente asociado a una célula cancerosa, una bacteria o un virus (FIG. 1C).

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único o las construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único se pueden administrar solos o en combinación con otros tipos de tratamientos, tales como medicamentos contra el cáncer, antibióticos, medicamentos antiparasitarios y antivirales. Los anticuerpos de dominio único o las construcciones de anticuerpos de dominio único de la presente solicitud se pueden administrar simultáneamente o en conjunto con los otros tipos de tratamientos.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único o las construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único se pueden administrar en combinación con fármacos de molécula grande (biológicos) y/o fármacos de molécula pequeña y/o terapias basadas en células

para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de dichos fármacos incluyen, entre otros, anticuerpos anti-HER2 (trastuzumab, pertuzumab, Enhertu, etc.), anticuerpos anti-ER, anticuerpos anti-PR, anticuerpos anti-PDL-1, anticuerpos anti-PD-1 (p. ej., Keytruda), anticuerpos anti-CTL4, anticuerpos anti-CD47, anticuerpos anti-CD19, cisplatino, paclitaxel, irinotecán, 5-FU, tisagenlecleucel, axicabtagen ciloleucel, brexucabtagen autoleucel y lisocabtagen maraleucel, entre otros.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único o las construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único se pueden administrar en combinación con fármacos de molécula grande (biológicos) y/o fármacos de molécula pequeña y/o terapias basadas en células para el tratamiento de infecciones bacterianas. Ejemplos de dichos fármacos incluyen, entre otros, bezlotoxumab, raxibacumab, obiltoxaximab, suvrattoxumab y antibióticos de uso común (p. ej., grupo de penicilina, macrólidos, grupo de cefalosporina, etc.).

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único o las construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único se pueden administrar en combinación con fármacos de molécula grande (biológicos) y/o fármacos de molécula pequeña y/o terapias basadas en células para el tratamiento de infecciones parasitarias. Ejemplos de dichos fármacos incluyen, entre otros, metronidazol, tinidazol e ivermectina, entre otras opciones.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único o las construcciones que comprenden los anticuerpos de dominio único se pueden administrar en combinación con fármacos de molécula grande (biológicos) y/o fármacos de molécula pequeña y/o terapias basadas en células para el tratamiento de infecciones virales. Ejemplos de dichos fármacos incluyen, entre otros, remdesivir, baricitinib, palivizumab, zanamivir, peramivir, oseltamivir y baloxavir marboxilo, entre otros.

El anticuerpo o la construcción de dominio único están considerablemente purificados (por ejemplo, considerablemente libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). Se conocen varios sistemas de administración y pueden decorarse en la superficie con un anticuerpo de la presente solicitud, lo cual incluye liposomas, micropartículas, microcápsulas, células diseñadas, virus u otros vectores capaces de expresar el anticuerpo (ver, por ejemplo, Wu et al., J Biol Chem 262:4429 (1987)).

El anticuerpo de dominio único o la estructura constructiva se puede administrar al mamífero de cualquier manera aceptable. Los métodos de introducción incluyen, entre otros, las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal, epidural, por inhalación y oral y, si se desea, para tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. El anticuerpo de dominio único o la construcción o las composiciones pueden administrarse por

cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir el anticuerpo terapéutico de dominio único o la construcción o las composiciones de la presente solicitud en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal: la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. Además, el anticuerpo o la construcción de dominio único se administra adecuadamente mediante infusión en pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo o la construcción de dominio único. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente aerosolizante. El anticuerpo o la construcción de dominio único también se puede administrar en los pulmones de un paciente en forma de una composición de polvo seco (véase, por ejemplo, la pat. estadounidense n.º 6,514,496).

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar el anticuerpo terapéutico de dominio único o la construcción o las composiciones de la presente solicitud localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y sin carácter limitativo, infusión local, aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante, siendo dicho implante de una material poroso, no poroso o gelatinoso, lo cual incluye membranas, tales como membranas de silastic o fibras. Preferiblemente, al administrar un anticuerpo de dominio único o una construcción de la presente solicitud, se debe tener cuidado de utilizar materiales en los que la proteína no se absorba.

En otra modalidad, el anticuerpo o la construcción de dominio único puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, Science 249:1527 (1990); Treat, et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein, et al., eds., págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-27; ver generalmente *ibid.*).

En incluso otra modalidad, el anticuerpo o la construcción de dominio único se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede usar una bomba (ver Langer, Science 249:1527 (1990); Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201 (1987); Buchwald, et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N Engl J Med 321:574 (1989)). En otra modalidad, se pueden usar materiales poliméricos (ver Medical Applications of Controlled Release, Langer, et al.,

eds., CRC Press (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen, et al., eds., Wiley (1984); Ranger, et al., J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61 (1983); ver también Levy, et al., Science 228:190 (1985); During, et al., Ann Neurol 25:351 (1989); Howard, et al., J Neurosurg 71:105 (1989)). En aún otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico.

La presente solicitud también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad con eficacia terapéutica del anticuerpo o de la construcción de dominio único y un vehículo fisiológicamente aceptable. En una modalidad específica, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado/a por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Esos vehículos fisiológicos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes de amortiguación del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con agentes de unión y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de vehículos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Esas composiciones contendrán una cantidad eficaz del anticuerpo, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación debería adaptarse al modo de administración.

En al menos una modalidad, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres

humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en agente de amortiguación acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan separados o mezclados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sachet, que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se deba administrar mediante infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contenga solución salina o agua de grado farmacéutico esterilizada. Cuando la composición se administre por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único (VHH) y las construcciones de la presente solicitud se pueden conjugar con profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos o PEG. Por ejemplo, los anticuerpos de dominio único pueden conjugarse o fusionarse con un agente terapéutico, que puede incluir, entre otros, etiquetas detectables tales como etiquetas radiactivas, un inmunomodulador, una hormona, una enzima, un oligonucleótido, un agente terapéutico fotoactivo o agente de diagnóstico, un agente citotóxico, que puede ser un fármaco o una toxina, un agente potenciador de ultrasonido, una etiqueta no radiactiva o una combinación de estas opciones. Los anticuerpos de dominio único pueden etiquetarse de forma detectable acoplándolos a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del polipéptido de unión al antígeno con etiquetado quimioluminiscente se determina luego mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de etiquetado quimioluminiscente adecuados incluyen, entre otros, luminol, isoluminol, imidazol, sal de acridinio, éster de acridinio termomático y éster de oxalato.

La presente solicitud también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la presente solicitud. En asociación opcional con ese o esos recipientes puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleje la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración humana.

En un aspecto de la presente solicitud se proporciona además un método para tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de dominio único o construcciones de la

presente solicitud como se describió anteriormente. En algunas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma de ovario, cáncer renal, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pulmonar, glioblastoma, cáncer de próstata, carcinoma de vejiga o linfoma. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad respiratoria, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmunitaria. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad infecciosa causada por un microorganismo, tal como un virus que incluye virus de ARN y ADN, una bacteria grampositiva, una bacteria gramnegativa, un protozoo o un hongo.

10 **Construcciones que comprenden anticuerpos de dominio único que muestran afinidad hacia CD16a y HER2**

De acuerdo con una o más modalidades, la construcción de anticuerpo biespecífico de dominio único de la presente solicitud puede unirse selectivamente a CD16a en linfocitos NK y a HER2 en células cancerosas que expresen HER2 (denominadas en el presente documento “BiKE:HER2/CD16a”). Por lo tanto, en una o más modalidades, dos VHH se pueden fusionar entre sí con o sin un enlazador para crear un BiKE con especificidad y afinidad hacia el receptor de CD16a y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b. En una o más modalidades, el enlazador puede ser un enlazador de HMA, como se mostrará en la Tabla 3 más adelante, por ejemplo. En una o más modalidades, el enlazador puede ser un enlazador basado en (GGGSG)_n (n=1, 2, 3,...), o cualquier otro enlazador flexible, semiflexible o rígido.

En una o más modalidades, el BiKE:HER2/CD16a de la presente solicitud se puede utilizar para dirigir los linfocitos NK y destruir las células cancerosas HER2+. Los BiKE con especificidad y afinidad hacia el receptor de CD16a y HER2 pueden abordar los desafíos mencionados anteriormente y otros problemas relacionados con la destrucción eficaz de las células cancerosas que expresan HER2. En una o más modalidades, el BiKE:HER2/CD16a puede comprender al menos una de las secuencias de aminoácidos de la Tabla 1 y al menos una de las secuencias de aminoácidos de la Tabla 2. A continuación se mostrará un ejemplo en la Tabla 3.

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos del BiKE:HER2/CD16a diseñado (SEQ ID NO: 20) mediante la fusión de anti-HER2 VHH E5 con VHH anti-CD16a C1 a través de un enlazador de HMA. VHH anti-HER2 (ver la Tabla 18). Las etiquetas de c-myc (GSEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 1)) e histidina (HHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2)) se construyen en el extremo C, respectivamente.

Nombre	Secuencia de aminoácidos
--------	--------------------------

BiKE E5C1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLDCAASGRTLSSYVVGWFRQAPGKEREVVAI GWSRTSTFYTDSVKGRFTISRDNTEENTVYLQMNSLKPGDTAVYYCAADSSPR RWDRESDFGSWGQGTQVTVSS PSGQAGAAASESLFVSNHASQVQLQESG GGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRLYRMGWFRQAPGKEREFVGSIKMIDGSTLY GDPVKGRFTISRDNTEKFMAYLQMNSLKPEDTAVYYCASVSRVTGSYDSWGQ GTQVTVSSWELQGSEQKLISEEDLHHHHHHHHHHHHH* (SEQ ID NO: 20)
-----------	---

*VHH HER2 E5 – enlazador de HMA (**NEGRITA**)– VHH CD16 C1– sitio de proteasa (*cursiva*) – etiqueta cMyc – etiqueta His

Ensayos y métodos de uso de anticuerpos de dominio único

5 En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único (VHH) de la presente solicitud se pueden usar para diversas aplicaciones fisicoquímicas y biológicas.

Por ejemplo, en una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único se pueden usar para ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por su sigla en inglés). Por ejemplo, en al menos una modalidad de la presente solicitud, se realiza un método de ELISA en el que una muestra
 10 que comprende uno o más antígenos (por ejemplo, HER2 o CD16a) se inmoviliza sobre un soporte sólido. Luego, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud se aplican sobre la superficie de la muestra como anticuerpo primario, de modo que pueda unirse al o a los antígenos. Se puede utilizar un anticuerpo secundario (p. ej., anticuerpo anti-etiqueta His o anti-etiqueta HA) que esté enlazado a una enzima tal como HRP (peroxidasa de rábano picante) para reconocer el VHH unido
 15 al antígeno. En una etapa final, se añade una sustancia que contiene el sustrato de la enzima. Si los anticuerpos de dominio único se unen al o a los antígenos, la reacción posterior produce una señal detectable en ellos (p. ej., un cambio de color).

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud se pueden usar en métodos de citometría de flujo. En una o más modalidades, se pueden usar métodos
 20 de citometría de flujo con los anticuerpos de dominio único del presente documento como anticuerpos primarios para determinar la presencia de uno o más antígenos en las superficies de las células. Por ejemplo, en al menos una modalidad, se pueden usar métodos de citometría de flujo con los anticuerpos de dominio único del presente documento como anticuerpos primarios para detectar específicamente proteínas HER2 o CD16a en la superficie de células cancerosas.

25 Específicamente, de acuerdo con una o más modalidades, se realiza un método de citometría de flujo en el que una muestra que contiene células cancerosas y VHH anti-HER2 (o linfocitos NK y VHH anti-CD16a) se suspende en un fluido y se inyecta en un instrumento de citómetro de flujo.

Luego, un analizador de citometría de flujo proporciona datos cuantificables de la muestra, tales como si las células cancerosas son células cancerosas HER2+ o los linfocitos NK son linfocitos NK CD16a+. Se puede incluir una muestra de células cancerosas sospechosas de ser células cancerosas HER2+ en una muestra, y se pueden aplicar anticuerpos de dominio único anti-HER2 de la presente solicitud para unirse al antígeno HER2 en la superficie de las células. De manera similar, se puede incluir una muestra de linfocitos NK sospechosos de ser linfocitos NK CD16a+ en una muestra, y se pueden aplicar anticuerpos de dominio único anti-CD16a de la presente solicitud para unirse al antígeno CD16a en la superficie de las células. A continuación, se puede utilizar un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo antietiqueta His) enlazado a una sonda fluorescente para unirse al anticuerpo de dominio único. Luego, la muestra se puede analizar mediante un citómetro de flujo para detectar la expresión de HER2 o CD16a. En otras palabras, los VHH anti-HER2 de la muestra se utilizan para medir la expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas.

El mismo método de citometría de flujo descrito anteriormente se puede utilizar para detectar antígenos en las superficies de otros objetivos, tales como bacterias, virus u otros tipos de células cancerosas, sustituyendo otro objetivo (bacterias, virus u otros tipos de células cancerosas) por las células cancerosas HER2+ sospechosas en la muestra y utilizando un anticuerpo de dominio único específico para el otro objetivo en lugar del VHH anti-HER2. En las secciones de Ejemplos se proporcionarán otros ejemplos de métodos para la citometría de flujo para los VHH de la presente solicitud.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único (VHH) de la presente solicitud se usan en aplicaciones de inmunohistoquímica, tales como métodos de inmunohistoquímica para identificar células cancerosas HER2+ en tejidos. En una o más modalidades, los VHH de las presentes solicitudes también se usan en métodos para el fenotipado del cáncer *ex vivo* usando histopatología. Por ejemplo, en el fenotipado del cáncer *ex vivo* mediante inmunohistoquímica, los tejidos tumorales sospechosos se pueden criosectionar y fijar en portaobjetos de tejido. Luego, los cortes de tejido se pueden teñir con VHH anti-HER2, tras lo cual sigue la aplicación de un anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente (p. ej., antietiqueta His o antietiqueta HA). La fotomicrografía se puede realizar utilizando un microscopio (p. ej., Leica) para detectar la presencia o ausencia de expresión de HER2 en cortes de tejido. El presente método de fenotipado del cáncer *ex vivo* también se puede realizar para otros tipos de cánceres utilizando anticuerpos de dominio único específicos para otros antígenos del cáncer (p. ej., EGFR, VEGFR).

En una o más modalidades, los VHH de la presente solicitud se usan en aplicaciones de obtención de imágenes celulares. Por ejemplo, en una o más modalidades, se puede usar

microscopía confocal o fluorescente con los presentes anticuerpos de dominio único como anticuerpos primarios para determinar la presencia de antígenos en las superficies de células objetivo u otros objetivos (por ejemplo, virus). Por ejemplo, en una o más modalidades, se pueden usar métodos de microscopía con los anticuerpos anti-HER2 de dominio único de la presente solicitud como anticuerpos primarios para unirse a proteínas HER2 en la superficie de células cancerosas. A continuación, se puede utilizar un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo antietiqueta His) enlazado a una sonda fluorescente para unirse al anticuerpo de dominio único. Luego, la muestra se puede estudiar con un microscopio confocal o fluorescente para detectar la expresión de HER2 y examinar la internalización. En otras palabras, los VHH anti-HER2 de la muestra se utilizan para medir la expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas. Los mismos métodos de microscopía pueden utilizarse para detectar antígenos en las superficies de otros objetivos, tales como bacterias, virus u otros tipos de células cancerosas, sustituyendo otras muestras (bacterias, virus u otros tipos de células cancerosas) por la muestra de células cancerosas HER2+ sospechosas y utilizando un anticuerpo de dominio único específico para otro objetivo en lugar del VHH anti-HER2.

En una o más modalidades, los anticuerpos de dominio único de la presente solicitud (por ejemplo, VHH anti-HER2) se usan en aplicaciones de fenotipado de cáncer *in vivo* para identificar diferentes tipos de lesiones cancerosas en un sujeto mediante imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes por PET/SPECT/CT o cualquier otro trazador radiactivo o no radiactivo. Por ejemplo, de acuerdo con al menos una modalidad, un método para identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en un sujeto mediante MRI y/o PET/SPECT/CT incluye las etapas de administrar una sustancia para la obtención de imágenes que se conjuga con el VHH anti-HER2 a un sujeto, realizar una MRI y/o PET/SPECT/CT del sujeto para producir una imagen (p. ej., imagen de MRI y/o PET/SPECT/CT), e identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en el escaneo de MRI y/o PET/SPECT/CT. El presente método de fenotipado del cáncer *in vivo* también se puede realizar para otros tipos de cánceres utilizando anticuerpos de dominio único específicos para otros antígenos del cáncer (p. ej., EGFR, VEGFR).

En al menos una modalidad, los VHH anti-CD16a de la presente solicitud se usan en métodos de seguimiento de linfocitos NK *in vivo*. En una o más modalidades, los VHH anti-CD16a etiquetados de la presente solicitud se usan en el seguimiento de linfocitos NK *in vivo* en un sujeto mediante imágenes por resonancia magnética (MRI), imágenes por PET/SPECT/CT o cualquier otro trazador radioactivo o no radioactivo. Por ejemplo, un método de seguimiento de linfocitos NK alogénicos o linfocitos NK autólogos en un sujeto mediante MRI y/o PET/SPECT/CT incluye las etapas de administrar una sustancia para la obtención de imágenes que se conjuga con el VHH anti-CD16a a

un sujeto, realizar una MRI y/o PET/CT del sujeto para producir una imagen (p. ej., imagen de MRI y/o PET/SPECT/CT), e identificar la ubicación anatómica de linfocitos NK en el escaneo de MRI y/o PET/CT. En una o más modalidades, el método de seguimiento de células in vivo anterior también se puede utilizar para un seguimiento de linfocitos T CD16a+, macrófagos, monocitos, mastocitos y basófilos.

En una o más modalidades, también se proporciona una construcción para tratar cánceres HER2 positivos. La construcción puede presentar una actividad anticancerígena significativa hacia los cánceres HER2 positivos y, por lo tanto, puede usarse como parte de un régimen de inmunoterapia. En al menos una modalidad, la construcción puede incluir uno o más anticuerpos de dominio único (VHH) anti-HER2 en fusión con uno o más VHH anti-CD16a de la presente solicitud para dirigir los linfocitos NK y facilitar la destrucción de las células cancerosas HER2+.

Los elementos y aspectos adicionales de los VHH (anticuerpos de dominio único) y las construcciones que comprenden los VHH de la presente solicitud y los métodos asociados se describirán con más detalle en la sección de Ejemplos a continuación. Debe entenderse que las modalidades descritas en los ejemplos son solamente ilustrativas y no limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS – SECCIÓN 1

Materiales y métodos

A continuación, siguen los materiales utilizados para la generación, el aislamiento y la caracterización de VHH utilizados en los siguientes experimentos. La lista de células, anticuerpos y reactivos utilizados en este estudio se enumerarán en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Lista de materiales utilizados para generar y caracterizar nanocuerpos anti-HER2.

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Agarosa Ni-NTA	Qiagen (MD, EUA)	30230
Células FreeStyle™ 293-F	Gibco™ (NY, EUA)	R79007
Medio de expresión FreeStyle™ 293	Gibco™ (NY, EUA)	12338018
Agente antiaglomerante (1000X)	Gibco™ (NY, EUA)	0010057AE
Solución de azul tripán, 0,4 %	Gibco™ (NY, EUA)	15250061
Suero fetal bovino	Gibco™ (NY, EUA)	10437028
Kit QIAprep Spin Miniprep	Qiagen (MD, EUA)	27106
Kit QIAquick PCR Purification	Qiagen (MD, EUA)	28106
Kit QIAquick Gel Extraction	Qiagen (MD, EUA)	28704

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Conjunto de ADNasa libre de ARNasa	Qiagen (MD, EUA)	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen (MD, EUA)	74104
QIAGEN Plasmid Mega Kit	Qiagen (MD, EUA)	12181
Sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ IV	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	18091050
Tinte de gel de ADN seguro SYBR™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	S33102
Agente de amortiguación TAE UltraPure™ DNA Typing Grade™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	24710030
Agente de amortiguación de lisis y extracción RIPA	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	89901
DPBS, sin calcio, sin magnesio	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	14190250
Inhibidor de proteasa AEBSF	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	78431
Agua libre de nucleasas (no tratada con DEPC)	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AM9937
Tubo de reacción rápida MicroAmp™ con tapa	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	4358297
Placa de almacenamiento Deepwell de 96 pocillos Abgene™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AB0932
Sellos de placa adhesiva de ventilación	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AB0718
Medio S.O.C.	Invitrogen™ (MA, EUA)	15544034
Polietilenimina, lineal, MW 25000	PolyScience (PA, EUA)	23966-1
Carbenicilina (disódica)	GoldBio (MO, EUA)	C-103-25
Isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido (IPTG)	Teknova (CA, EUA)	I3325
Histopaque®-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	10771-500ML
Solución de tripsina-EDTA	MiliporeSigma (MA, EUA)	T4049-100ML
D-(+)-glucosa	MiliporeSigma (MA, EUA)	G8270-1KG
Fago auxiliar resistente a	Integrated Science (VA,	200251

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
interferencias VCSM13	USA)	
Cubetas de electroporación Gene Pulser®/MicroPulser™, espacio de 0,1 cm	Bio-Rad (PA, EUA)	1652083
Estándares de color duales Precision Plus Protein™	Bio-Rad (PA, EUA)	1610374
Agente de amortiguación de recubrimiento de ELISA	Bio-Rad (PA, EUA)	BUF030C
Compuesto O.C.T. Tissue-Plus™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	23-730-571
Sacarosa	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	S7903-1KG
Sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidrato	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	E5134-100G
Solución de sustrato 1-Step™ Turbo TMB-ELISA	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	34022
Escherichia coli (Migula) WK6	ATCC (VA, EUA)	ATCC 47078
Terrific Broth	IBI Scientific (IA, USA)	IB49141
Caldo LB Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49030
Agar LB de Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49100
Nunc MaxiSorp™ de fondo plano	Invitrogen™ (MA, EUA)	44-2404-21
Leche en polvo, descremada (leche desnatada), en polvo	VWR (PA, EUA)	97063-958
Reactivo de proliferación celular WST-1	Abcam (MA, EUA)	11644807001
Tubos de proteína LoBind, limpios para PCR	Eppendorf (MA, EUA)	0030108302
Biosensor de estreptavidina (SA) Octet®	Sartorius (PA, EUA)	18-5019
Sistema Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	154526PK
Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	23225

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Enzima de restricción sapI	NEB (MA, EUA)	R0569L
ADN polimerasa de alta fidelidad Q5®	NEB (MA, EUA)	M0491S
Kit de PCR de alta fidelidad Q5®	NEB (MA, EUA)	E0555S
Mezcla de solución de desoxinucleótido (dNTP)	NEB (MA, EUA)	N0447S
Escalera de ADN de 100 pb Quick-Load® Purple	NEB (MA, EUA)	N0551S
Tinte de carga en gel, morado	NEB (MA, EUA)	B7024S
ADN ligasa T4	NEB (MA, EUA)	M0202L
Escalera de ADN TrackIt™ de 100 pb	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	10488058
Agarosa UltraPure™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	16500100
Medio 2x YT	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	Y2377-250G
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	81260-1KG
Mezcla maestra de PCR verde de inicio en caliente Platinum™ II	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	14001012
Células electrocompetentes TG1	Lucigen (WI, EUA)	60502-2
Proteína ErbB 2 humana recombinante	Abcam (MA, EUA)	ab168896
Proteína ErbB 3 humana recombinante	Abcam (MA, EUA)	ab196072
Proteína ErbB 4 humana recombinante	Abcam (MA, EUA)	ab85602
Proteína EGFR humana recombinante (quimera de Fc)	Abcam (MA, EUA)	ab155726
IgG de cabra anticonejo H&L (FITC)	Abcam (MA, EUA)	ab6717
IgG de cabra antihumano H&L (HRP)	Abcam (MA, EUA)	ab97165
IgG de cabra antihumano H&L (FITC)	Abcam (MA, EUA)	ab6854
IgG1 humana, kappa	Abcam (MA, EUA)	ab206198
Anticuerpo anti-c-Myc (HRP)	Abcam (MA, EUA)	ab19312
Anticuerpo antietiqueta HA (HRP)	Abcam (MA, EUA)	ab1190
Anticuerpo de cadena ligera y pesada de IgG de llama	Bethyl (TX, EUA)	A160-100P
Anticuerpo policlonal con etiqueta His,	Thermo Scientific™ (MA,	600-444-382

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
DyLight 680	EUA)	
Proteína Her2/ErbB2 humana biotinilada, His, Avitag™	AcroBiosystem (DE, EUA)	HE2-H82E2-25ug
Trastuzumab (Trazimera™, Pfizer)	Cancer Institute of New Jersey Pharmacy Store	N/A
Pertuzumab (Perjeta™, Genentech)	Cancer Institute of New Jersey Pharmacy Store	N/A
Células de cáncer de mama BT-474	ATCC (VA, EUA)	HTB-20™
Células de cáncer de mama SK-BR-3	ATCC (VA, EUA)	HTB-30™
Células de cáncer de ovario SKOV-3	ATCC (VA, EUA)	HTB-77™
MDA-MB-231	ATCC (VA, EUA)	HTB-26™
Medio Hybri-Care	ATCC (VA, EUA)	46-X
Medio L-15 de Leibovitz	ATCC (VA, EUA)	30-2008
DMEM/F-12, suplemento GlutaMAX™	Gibco™ (NY, EUA)	10565018
Suero fetal bovino, calificado, Estados Unidos	Gibco™ (NY, EUA)	26140079
Penicilina-estreptomicina (10 000 U/mL)	Gibco™ (NY, EUA)	15140122
Insulina (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	I0516-5ML
Medio 5A (modificado) de McCoy	Gibco™ (NY, EUA)	16600108
Medio RPMI-1640	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	R8758-6X500ML

Expresión y purificación de la proteína HER2

El gen que codifica el dominio extracelular de HER2 (Uniprot ID P04626) fue diseñado, sintetizado y clonado en un vector plasmídico superpuesto (eHER2bac) por VectorBuilder (IL, EUA) en dirección anterógrada con respecto a un promotor de EF1 α . Se diseñó una señal secretora en el extremo N y 12Xetiqueta His (SEQ ID NO: 2) en el extremo C de la secuencia de proteínas para facilitar la secreción de la proteína expresada en los medios de cultivo y la purificación mediante cromatografía de Ni-NTA, respectivamente (**Tabla 5**). Se eligió el sistema celular FreeStyle™ 293-F para llevar a cabo la expresión de proteínas, ya que la proteína HER2 humana está fuertemente glicosilada. El día de la transfección, las células 293-F se contaron y se volvieron a suspender a una densidad de $\sim 3 \times 10^6$ células/ml en 100 mL en un matraz giratorio reutilizable de 250 mL que

contenía medio de expresión FreeStyle™ 293 fresco y se incubaron a 37 °C (5 % de CO₂) durante 30 min. Para transfectar las células 293-F, se formó un complejo de ADN plasmídico (eHER2bac) con PEI (1 µg por cada 10⁶ células) en una relación 1:4 (pDNA: PEI) y se incubó a temperatura ambiente (RT, por su sigla en inglés) durante 20 min. Luego, se agregaron complejos pDNA:PEI a las células 293-F por goteo con agitación constante. El matraz que contenía las células 293-F transfectadas se transfirió a una incubadora de CO₂ y se agitó a 90 rpm durante 24 h. Al día siguiente, se añadió el doble de medio fresco (200 mL) a las células transfectadas y la expresión de la proteína continuó durante 8-10 días hasta que la viabilidad celular cayó por debajo del 85 % (determinada según el azul tripán). Luego, las células se recolectaron mediante centrifugación (10 000 g, 10 min, 4 °C) y el sobrenadante que contenía la proteína de interés se transfirió a un tubo nuevo y se incubó con 300 µL de resina Ni-NTA durante la noche a 4 °C mientras se agitaba. Al día siguiente, las resinas se cargaron en una columna de cromatografía y se lavaron con 20 ml de agente de amortiguación de lavado (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 7,5 mM, pH 7,4). La proteína HER2 purificada se eluyó utilizando 500 µL de agente de amortiguación de elución (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 250 mM, pH 7,4). La pureza de la proteína HER2 eluida se evaluó mediante SDS-PAGE.

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de la proteína HER2 recombinante secretora clonada en el plásmido eHER2bac con un peso molecular teórico de 73,56 kDa (SEQ ID NO: 21)

Nombre	Secuencia de aminoácidos
Dominio extracelular de HER2	METDTLLLWVLLWVPGSTGDAAQPARRASLWELQTQVCTGDMKLRLPAS PETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYPNTASLSFLQDIQEVQGYVLIHNQV RQVPLQRLRIVRGTTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRS LTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMC KGSRCWGESSEDCQSLTRTVACAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKH SDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRTYTFGASCVTACPYN YLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVR AVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGY LYISAWPDSLPLDSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGS GLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLC ARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHP ECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPGKPDLSYMPIWKF PDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTWELQLEEGPHHHHHH HHHHHH*

	(SEQ ID NO: 21)
--	-----------------

*Señal secretora (**NEGRITA**) - sitio de proteasa (*cursiva*) - ectodominio de HER2 - etiqueta His (HHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2))

Immunización de llama con proteína HER2

5 La proteína HER2 purificada se envió a Capralogics Inc. (Gilbertville, MA) para inmunizar la llama (**FIG. 2**). Una llama hembra de 1,5 años de edad fue inmunizada seis veces (cada dos semanas) utilizando 500 µg de proteína HER2 por inyección. En cuatro de seis inyecciones, la proteína HER2 se mezcló con adyuvante de Freund completo o incompleto para maximizar la respuesta inmunitaria. En la cuarta y sexta inyección, se inyectó HER2 con purificación sin ningún
10 adyuvante. Diez días después de la cuarta inyección, el día 52, se recolectaron 50 ml de suero y se realizó un ELISA para medir los niveles de IgG en suero de llama. Una vez confirmada la respuesta de IgG, se continuó el procedimiento de inmunización durante cuatro semanas más. Cinco días después de la última inyección, se recolectaron 600 ml de sangre de llama y luego se diluyeron con 600 ml de DPBS suplementado con FBS al 3 %.

15

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC totales se aislaron utilizando el método Ficoll (Histopaque®-1077). En resumen, se agregaron 10 mL de Ficoll a un tubo de 50 ml. A continuación, se añadieron por goteo 20 ml de sangre diluida de tal forma que la interfaz entre la sangre y Ficoll permaneciera intacta. A
20 continuación, se separaron los glóbulos rojos y los granulocitos de las PBMC mediante centrifugación (400 g, 20 min, RT) con el freno quitado. Este proceso enriqueció las PMBC en una capa entre el suero y Ficoll. El suero se eliminó lentamente y las PBMC se recolectaron en un tubo nuevo y se lavaron dos veces usando DPBS suplementado con FBS al 3 %. Las PBMC aisladas se utilizaron para la generación de bibliotecas.

25

Generación de bibliotecas

Utilizando PBMC aisladas, se extrajo el ARN total (RNeasy Mini Kit) y se sintetizó el ADNc utilizando oligo-dT y hexámero aleatorio (sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ IV). Los ADNc de VHH se amplificaron mediante PCR anidada (ADN polimerasa de alta fidelidad Q5®)

utilizando dos conjuntos de cebadores (**Tabla 6**) y un protocolo de amplificación (**Tabla 7**). Los productos de la PCR se clonaron en el fagémido pMECS-GG (proporcionado amablemente por el Dr. S. Muyldermans, Bélgica) usando la enzima de restricción SapI y la ADN ligasa T4 usando el protocolo de clonación Golden Gate. Luego, los fagémidos recombinantes se transformaron en bacterias TG1 mediante un electroporador utilizando cubetas de electroporación con un espacio de 0,1 cm. En resumen, 5 µL de fagémido recombinante que albergaba la secuencia de VHH se mezclaron con 50 µL de células TG1 competentes y se transfirieron a una cubeta de electroporación. Después de 20 min en hielo, se realizó la electroporación usando un voltaje de 2,5 kV, una resistencia a 200 Ω y una capacitancia a 25 µF. Se transformaron diez viales de TG1 competentes para mantener la diversidad de la biblioteca. Luego se añadió 1 ml de medio SOC y se transfirió a un tubo de 50 ml. Después de 60 min de incubación a 37 °C, las bacterias se recolectaron a 6000 xg durante 15 min. El sedimento se transfirió a seis matraces de 100 mL de LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL. Al día siguiente, las bacterias de los seis matraces se centrifugaron y se volvieron a suspender en 20 mL de medio LB nuevo. Después de agregar glicerol al 15 %, la biblioteca se almacenó a -80 °C para la presentación en fagos.

Tabla 6: Lista de cebadores con secuencias correspondientes que se utilizaron para producir ADNc de VHH.

Nombre	Secuencia
CALL001	5'- GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3' (SEQ ID NO: 22)
CALL002	5'- GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3' (SEQ ID NO: 23)
VHH-inverso	5'- GATGGGCTCTTCTGTGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG- 3' (SEQ ID NO: 24)
VHH-directo	5'-CTAGTGCTCTTCCGCTTGGAGACGGTGACCTGGGT-3' (SEQ ID NO: 25)

Tabla 7: Protocolo de PCR para la amplificación de los cebadores.

Ciclo	Etapas	Temperatura	Tiempo
1 X	Desnaturalización inicial	95C	3 min
35 X	Desnaturalización	95C	1 min
	Hibridación	50 – 60 C	1 min

	Síntesis	72C	1 min
1 X	Extensión definitiva	72C	10 min
1 X		4C	-

Presentación en fagos

Se llevaron a cabo cuatro rondas de inmunoadsorción para llegar a una biblioteca de VHH específica. Cada ronda se llevó a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, se inocularon alrededor de 2×10^9 $DO_{600 \text{ nm}}$ ($1 \text{ } DO_{600 \text{ nm}} = 2,66 \times 10^9$ células/mL) de la biblioteca de VHH en 100 mL de caldo LB. Cuando la DO_{600} alcanzó 0,6 - 0,8, se añadieron 500 μL de fago auxiliar VCSM13 y se incubaron a 37 °C durante 1 - 2 h sin agitación. Luego se añadió kanamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el cultivo bacteriano continuó durante la noche. Para la presentación en fagos, se usaron 100 μL de proteína HER2 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para recubrir una placa de 96 pocillos y se incubaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación (10 000 g, 20 min, 4 °C). El sobrenadante se transfirió a un tubo esterilizado preenfriado de 50 mL y se añadió PEG-NaCl al 10 % y se incubó a 4 °C durante 1 - 2 h. Posteriormente, los fagos se recolectaron mediante centrifugación (3000 g, 20 min, a 4 °C). Los fagos recolectados se lavaron dos veces usando DPBS. A continuación, mientras se bloqueaba la placa de ELISA utilizando agente de amortiguación de leche desnatada al 2 %, se incubaron fagos recombinantes con agente de amortiguación de bloqueo mientras se agitaba. Posteriormente, se agregaron 100 μL de fago recombinante que mostraba VHH de interés a una placa recubierta con HER2 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (RT) mientras se agitaba a 700 rpm. Después de lavar diez veces usando DPBS/Tween al 0,1 % y diez veces usando DPBS, los fagos unidos se recolectaron enzimáticamente usando tripsina (0,25 %). A continuación, se incubaron 10 μL de fagos recolectados con 100 μL de bacterias TG1, en crecimiento exponencial, durante 1 h a 37 °C. Luego, se transfirieron 100 μL de TG1 infectadas a 100 mL de medio LB que contenía carbenicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el cultivo bacteriano continuó durante la noche.

Preparación de extracto periplasmático y evaluación de afinidad y especificidad mediante ELISA

Después de cuatro rondas de presentación en fagos, se cribaron 190 colonias para encontrar el clon con la afinidad más alta hacia HER2. Primero, se añadió 1 mL de caldo LB suplementado con carbenicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una placa Deep-Well de 96 pocillos. La placa se cubrió con un sello de placa adhesivo de ventilación para minimizar la posible contaminación y evaporación. A

continuación, se inoculó una colonia en cada pocillo y se incubó a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se transfirieron 10 µL de cultivo durante la noche a una nueva placa Deep-Well de 96 pocillos que contenía 1 mL de caldo LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG a 1 mM y el cultivo bacteriano se cultivó durante la noche a 28 °C. Al día siguiente, la placa se centrifugó a 10 000 xg durante 10 min a 4 °C y se desecharon los sobrenadantes. Para preparar el extracto periplasmático, las bacterias sedimentadas se sometieron a un ciclo de congelación y descongelación tres veces (30 min a -20 °C y luego 10 min a RT). Luego, se agregaron 500 µL de DPBS a cada sedimento y se incubaron a RT durante 30 min mientras se agitaba. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y se transfirieron suavemente 400 µL de sobrenadante a una nueva placa de 96 pocillos y se almacenaron a 4 °C.

Para la determinación de la afinidad y la especificidad mediante ELISA, se utilizaron 100 µL de proteína HER2 a 1 µg/mL y otros tres miembros de la superfamilia de la heregulina, lo cual incluye HER1, HER3 y HER4, para recubrir placas de ELISA de 96 pocillos con alta capacidad de unión a proteínas Nunc MaxiSorp™ y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, cada pocillo se lavó tres veces con agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,1 %) y luego se incubó con agente de amortiguación de bloqueo (leche desnatada al 2 %) durante 2 h a RT para bloquear los sitios de unión de carácter libre. A continuación, se reemplazó el agente de amortiguación de bloqueo con 100 µL de extracto periplasmático de arriba y se incubó durante 1 h a RT mientras se agitaba a 700 rpm. Cada pocillo se lavó seis veces con agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,1 %) tras lo cual siguió la adición de 100 µL de anticuerpo anti-etiqueta HA con HRP (dilución 1:10 000) y la incubación durante 1 h a RT mientras se agitaba a 700 rpm. Cada pocillo se lavó nuevamente seis veces, tras lo cual siguió la adición de 50 µL de solución de sustrato 1-Step™ Turbo TMB-ELISA durante la incubación a RT durante 15 min (sin agitación y en la oscuridad). La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de solución de detención (ácido sulfúrico a 0,1 mM) y la placa se midió a 450 nm usando 630 nm como referencia (450/630 nm).

Expresión y purificación de VHH anti-HER2

Las secuencias de ADN que codifican los VHH seleccionados se sometieron a optimización de codones, se sintetizaron y se clonaron en el plásmido pHEN6c (proporcionado amablemente por el Dr. S. Muyldermans, Bélgica) de GeneWiz (NJ, EUA). Los plásmidos pHEN6c recombinantes que albergaban secuencias de VHH se transformaron en *E. coli* WK6 mediante choque térmico. Se complementó un medio TB de 750 mL con glucosa al 0,1 %, MgCl₂ a 1 mM y carbenicilina a

100 µg/mL. Luego se inocularon los medios con 10 ml de cultivo bacteriano WK6 y se cultivaron a 37 °C. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,5 - 0,8, la expresión de la proteína fue inducida por IPTG a 0,5 mM. La expresión de proteínas continuó a 28 °C durante la noche mientras se agitaba a 180 rpm. Al día siguiente, el cultivo bacteriano se centrifugó (10 000 xg, 10 min, 4 °C) para sedimentar las bacterias. El sedimento se volvió a suspender en 10 mL de agente de amortiguación TES (Tris-HCl a 200 mM, pH 8,0, sacarosa a 500 mM, EDTA a 1 mM) y se incubó en hielo durante 1 h mientras se agitaba. Luego, se diluyeron 15 mL de agente de amortiguación TES con agua destilada hasta un volumen total de 60 mL, se agregaron a la suspensión celular y se incubaron en hielo durante 45 min más mientras se agitaba. Las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación a 15 000 xg, 60 min, 4 °C. Luego, el sobrenadante se cargó en una columna de Ni²⁺ y se lavó con 30 mL de agente de amortiguación de lavado (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 25 mM, pH 7,4). Finalmente, la proteína se eluyó mediante agente de amortiguación de elución (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 250 mM, pH 7,4). La pureza de la proteína eluida (VHH) se evaluó mediante SDS-PAGE.

Evaluación de la capacidad de los VHH de reconocer células HER2+ mediante citometría de flujo

Se cultivaron células cancerosas BT474 (medio Hybri-Care/FBS al 10 %), SKOV-3 (McCoy's 5A/FBS al 10 %), MDA-MB-231 (Medio L-15 de Leibovitz/FBS al 10 %) y OVASC-1 (RPMI-1640/FBS al 15 %/insulina a 2,5 µg/mL) en los medios de cultivo correspondientes. Las OVASC-1 son células epiteliales de cáncer de ovario derivadas de ascitis obtenidas de una paciente con enfermedad metastásica avanzada (11, 12). Luego, los VHH expresados se incubaron con líneas de células cancerosas HER2⁺ (BT474, JIMT-1 y SKOV-3) y HER2⁻ (MDA-MB-231). Se contaron y se lavaron aproximadamente 10⁶ células usando DPBS-FBS al 1 %. Luego, se agregaron a las células un equivalente a 100 nM de sitios de unión de trastuzumab, Perjeta o VHH y se incubaron en hielo durante 60 min. Después del lavado, se agregaron anticuerpos antietiqueta His o anti-IgG humana conjugados con FITC y se incubaron en hielo durante 60 min. Las células se lavaron tres veces y luego se analizaron utilizando el citómetro de flujo Beckman-Coulter Gallios en las instalaciones centrales de citometría de flujo de Rutgers.

Medición de la cinética y afinidad de unión de VHH utilizando el interferómetro de biocapa

Para evaluar la afinidad de unión (K_D) y las tasas constantes de asociación (K_{asoc}) y disociación (K_{disoc}) de VHH, se utilizó un interferómetro de biocapa (BLI, por su sigla en inglés) del instrumento Octet RED96e (Sartorius) junto con un biosensor de estreptavidina (SA) Octet®. En este

experimento, se utilizó trastuzumab y pertuzumab como controles positivos. Después de remojar el sensor durante al menos 10 min en DPBS, se cargó HER2 biotinilado en el biosensor de estreptavidina (SA) durante 10 min para recubrir la estreptavidina en el sensor con HER2 biotinilado. A continuación, el sensor se sumergió en el agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) durante 2 min para alcanzar la línea de base. Luego, el sensor se sumergió en pocillos que contenían 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,25 y 0 nM de VHH anti-HER2 purificado, Herceptin® o Perjeta® durante 5 minutos (etapa de asociación). En la etapa de disociación, los pocillos se sumergieron en agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) durante 10 min para adquirir datos (**Tabla 8**). Luego, los datos se analizaron utilizando el software Octet Data Analysis HT 11.1. Para el análisis de los datos, los sensogramas se restaron de la referencia y se ajustaron a modelos de unión 1:1 y 2:1. Finalmente, la afinidad y la cinética se analizaron mediante “asociación y disociación”. Todos los estudios de adquisición y análisis de datos de BLI se realizaron en el Biophysics Core Facility del Departamento de Química de la Universidad de Princeton.

Tabla 8: Condiciones experimentales utilizadas para adquirir datos de BLI.

Etapas	Nombre	Tiempo/s	Velocidad de agitación
1	Comprobación de sensores	30	1000
2	Carga (HER2 a 10 µg/mL)	600	1000
3	Línea de base (DPBS + Tween 20 al 0,05 %)	120	1000
4	Asociación	300	1000
5	Disociación (DPBS + Tween 20 al 0,05 %)	600	1000

Ensayo de citotoxicidad celular

La toxicidad de los VHH anti-HER2, Herceptin® y Perjeta® se evaluó utilizando células cancerosas BT-474 y MDA-MB-231. En resumen, se colocaron 10×10^6 células en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron con VHH o anticuerpo a 1333,3, 13,3, 13, 0,13, 0,013 y 0 nM. Después de 72 h, se eliminó el medio y se agregaron 100 µL de medio nuevo suplementado con reactivo WST-1 al 10 %. Después de 4 h, la placa se leyó a 440 nm y 600 nm como longitud de onda de referencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se presentan como media $\pm$ de.

Evaluación de la aplicación de VHH anti-HER2 en imágenes celulares

La internalización de VHH después de unirse al receptor de HER2 en células cancerosas

SK-BR-3 se examinó mediante microscopía confocal. Se colocaron células SK-BR-3 a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células en un portaobjetos de cámara Nunc Lab-Tek™. Al día siguiente, las células se trataron con 20 nM de VHH o Herceptin® (trastuzumab) y se incubaron en hielo durante 60 min. A continuación, se descartó la solución de anticuerpos y todos los pocillos se lavaron tres veces con DPBS enfriado con hielo. Las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7 % durante 15 min a 37 °C tras lo cual siguieron tres etapas de lavado. Para examinar la tasa de internalización en diferentes momentos, se añadió a los pocillos medio RPMI suplementado con FBS al 5 % y se incubó a 37 °C durante 1, 2 y 4 h, tras lo cual siguió el lavado y la fijación. Posteriormente, las células se permeabilizaron utilizando Triton X100 al 0,1 % durante 15 minutos a RT. Las células se incubaron con agente de amortiguación de bloqueo (DPBS con BSA al 2 %) durante 2 h a RT. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario y se incubó a RT durante 1 h. Después de tres etapas de lavado, las células se tiñeron con DAPI a 300 nM durante 3 min y luego se lavaron tres veces. Finalmente, se observó la internalización de HER2 bajo un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems GmbH) con el lente objetivo de 63× utilizando aceite de inmersión. Las imágenes de la pila Z se tomaron cada una con una separación de 500 nm. Las imágenes de diferentes z fueron procesadas por el software de Leica.

Resultados y comentarios

Expresión de HER2 e inmunización de llama

Utilizando técnicas convencionales de ingeniería genética, el antígeno de HER2 se expresó en células HEK293 y se purificó. Los resultados de SDS-PAGE estimaron que la pureza de la HER2 purificado fue aproximadamente del 95 % (**FIG. 3A**). El peso molecular teórico de HER2 (sin señal secretora) es de 72 633 Da, al tiempo que la migración de la proteína se acerca al marcador de 100 kDa. Esto indica que la HER2 expresada estaba glicosilada. Luego, la HER2 purificada se usó para inmunizar la llama. La extracción de sangre cuatro semanas después de la inmunización seguida de ELISA mostró una elevación significativa en los niveles de IgG (DO_{450} de 1,5 después de una dilución 1/20 000), lo que indica una potente respuesta inmunitaria al antígeno de HER2 inyectado (**FIG. 3B**).

30

Aislamiento de PBMC, generación de bibliotecas, presentación en fagos y cribado de colonias

El día 75 después de la inmunización de la llama, se extrajo sangre, se aislaron PBMC, se generó un ADNc y una biblioteca de fagémidos y luego se utilizaron en la presentación en fagos. Después de cuatro rondas de presentación en fagos, se seleccionaron las colonias con la afinidad

de unión más alta al antígeno de HER2 y luego se examinaron para determinar su especificidad y selectividad (**FIG. 4A**). Los resultados de estos experimentos mostraron que los VHH aislados fueron específicos y selectivos con respecto al antígeno HER2 y con una interacción insignificante con HER1, HER3, HER4, BSA y leche desnatada (**FIG. 4B**).

5

Selección, expresión y purificación de VHH

Se secuenciaron, analizaron y agruparon los cuarenta VHH de unión a HER2 según el árbol filogenético. Se seleccionó una secuencia de cada grupo con la afinidad y especificidad más alta con respecto a HER2 y luego se construyó para que tuviera una etiqueta C-myc e his en su extremo C (**Tabla 9**). La adición de estas dos etiquetas permite que los VHH sean reconocidos por anticuerpos anti-c-myc y antietiqueta his. Luego, los VHH de mejor rendimiento se expresaron en *E. coli* WK6 y se purificaron. El rendimiento de expresión estuvo entre 3 - 5 mg/l para todos los VHH y con una pureza estimada superior al 95 % (**FIG. 5A**).

10

15

Tabla 9: Secuencias de aminoácidos de los VHH seleccionados. Las etiquetas de c-myc (GSEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 1)) e histidina (HHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2)) se construyen en el extremo C de los VHH, respectivamente.

Códigos de VHH anti-HER2	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4	Etiqueta
A1 (SEQ ID NO 11)	QVQLQESG GGLVQPGG SLRLSCAAS	GHTLS TYV	VAWFR QAPGKE RESVAA	IGWS SRSP	YYPDSVKG RFTISEDNT KNTVYLQM NSLKPDDT AVYYC	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
A3 (SEQ ID NO 3)	QVQLQESG GGLVQAGG SLRISCAAS	GRTS DLFP	VGWFR QAPGKE REIVAA	IRWS GGVI	GYGDPVKG RFTISTDNA KNTVYLQM NSLKPEDT AVYYC	AAGPRE STVTWN Y	WGQGTH VTVSS	Etiqueta C-Myc + His
C9 (SEQ ID NO 4)	QVQLQESG GGLVQAGG SLRLSCAAS	GRTV SRYS	MGWFR QAPGKE REFVAA	IAWF GGW P	YYADSVKG RFTISRDNA KNTVYLQM NSLKPEDT	AARQWA RTWDY	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His

					AVYYC			
D6 (SEQ ID NO 5)	QVQLQESG GGLVQAGG SLTLSCAAS	GRTFS TYV	VGWFR QAPGKE RESVAA	IGWA SNSP	YYADSVKG RFTISRDNT KNTVYLQM KSLKPDDT AVYYC	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
E5 (SEQ ID NO 6)	QVQLQESG GGLVQAGG SLRLDCAAS	GRTLS SYV	VGWFR QAPGKE REVVA	IGWS RTST	FYTDSVKG RFTISRDNT ENTVYLQM NSLKPGDT AVYYC	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
E9 (SEQ ID NO 7)	QVQLQESG GGSVQAGG SLKLSCAAS	GRTLS AYV	VGWFR QAPGR ERESVA A	IGWS THSV	YYADSVKG RFTISRDNT ENTVYLQM NSLKPDdT AVYYC	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
F2 (SEQ ID NO 8)	QVQLQESG GGLVQAGG SLKLSCAAS	GRTLS AYV	VGWFR QAPGR ERESVA A	IGWS THSV	YYADSVKG RFTISRDNT ENTVYLQM NSLKPDdT AVYYC	AADSSP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
F4 (SEQ ID NO 9)	QVQLQESG GGLVQAGG SLKLSCAAS	GRTLS AYV	VGWFR QAPGKE RESVAA	IGWS SRSP	YYPDSVKG RFTISEDNT KNTVYLQM NSLKPDdT AVYYC	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His
H7 (SEQ ID NO 10)	QVQLQESG GGLVQAGG SLRLSCAAS	GHTLS TYV	VAWFR QAPGKE RESVAA	IGWS TRSP	YYADSVKG RFTISEDNT KNTVYLQM NSLKPDdT AVYYC	AADSYP RRWDRE SDFGS	WGQGT QVTVSS	Etiqueta C-Myc + His

En la siguiente etapa, se evaluó la capacidad de los VHH de reconocer y unirse a HER2 en la superficie de las células cancerosas HER2⁺. Con este fin, se utilizaron los sitios de unión equimolares de los VHH purificados y los anticuerpos anti-HER2 aprobados por la FDA (trastuzumab y pertuzumab) para medir la expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas BT474 y SKOV-3 (HER2⁺) HER2⁺. Se utilizaron células cancerosas MDA-MB-231 y OVASC-1(HER2⁻) como controles negativos. Los datos de citometría de flujo mostraron que los VHH seleccionados pueden reconocer HER2 en la superficie de las células cancerosas HER2⁺, pero no en células cancerosas HER2⁻ (**FIG. 5B-5E**). La intensidad de fluorescencia media (MFI) total de las células etiquetadas con trastuzumab y pertuzumab parecía ser mayor que la de los VHH. La razón principal es que el anticuerpo secundario que se usó para detectar trastuzumab y pertuzumab era policlonal contra la cadenas ligera y pesada (1 anticuerpo/múltiples etiquetas), lo que derivó en un aumento significativo de la señal (**Tabla 10**). Por el contrario, el anticuerpo secundario que se utilizó para detectar etiqueta his en VHH fue monoclonal (1 VHH/1 etiqueta), lo que generó una menor intensidad de señal. No obstante, el nivel de unión de HER2 por parte de los VHH, determinado por el porcentaje de células etiquetadas, fue similar al de trastuzumab y pertuzumab (**Tabla 10**).

En general, los datos de citometría de flujo muestran que los VHH seleccionados pueden diferenciar las células HER2⁺ de las HER2⁻ y pueden usarse como reactivo adecuado para el fenotipado celular mediante citometría de flujo.

Tabla 10: MFI y porcentajes de células cancerosas HER2⁺ y HER2⁻ etiquetadas por parte de VHH, trastuzumab y pertuzumab.

	HER2 ⁺						HER2 ⁻					
Nombre	BT-474			SKOV-3			OVASC-1			MDA-MB-231		
	FITC+ (%)	FITC ⁻ (%)	Media	FITC+ (%)	FITC ⁻ (%)	Media	FITC+ (%)	FITC ⁻ (%)	Media	FITC+ (%)	FITC ⁻ (%)	Media
Pertuzumab	98,8	1,24	233 983	98,4	1,49	354 125	10,3	89,7	6180	68,9	31,1	3580
Trastuzumab	98,5	1,54	251 072	97,6	1,86	425 871	12	88	6283	67,5	32,5	5858
H7	98,3	1,72	100 269	94,8	5,02	99 877	6,62	93,4	4249	4,92	95,1	2081
F4	98,5	1,45	99 514	93,3	6,51	86 366	0,15	99,8	1294	5,06	94,9	2005
F2	98,6	1,42	99 461	93,1	6,68	100 019	7,83	92,2	4709	5,43	94,6	1937
E9	98,2	1,85	97 925	93,1	6,76	88 102	0,13	99,9	1327	5,31	94,7	1893
E5	98,4	1,59	102 038	93,3	6,45	106 010	4,89	95,1	3689	5,79	94,2	1989
D6	98,1	1,86	96 119	94,6	5,24	89 442	6,52	93,5	4327	5,94	94,1	2113

A1	98,8	1,23	97 001	94,1	5,78	100 706	6,46	93,5	4703	10,8	89,2	2589
Isotipo	0,45	99,6	935	0,97	99	915	0,67	99,3	1570	6,67	93,3	50

Evaluación de la citotoxicidad de los VHH

Para determinar si los VHH seleccionados inducen toxicidad para las células HER2+, se realizó un ensayo de toxicidad celular utilizando células cancerosas BT474 y SKOV-3. Se utilizó trastuzumab y pertuzumab como controles. Los resultados de este experimento revelaron que los clones E5 y A1, similares a trastuzumab y pertuzumab (**FIG. 6A-6B**), no indujeron toxicidad estadísticamente significativa a las células cancerosas SKOV-3 HER2+ incluso en concentraciones de hasta un máximo de 133 nM, lo que los hace agentes útiles para la obtención de imágenes celulares. Sin embargo, los linfocitos BT474 parecieron ser ligeramente sensibles a los VHH E5 y E9 con una caída de aproximadamente el 5 % en la viabilidad (*prueba t, $p < 0,05$) (**FIG. 6A-6B**). Esto sugiere la aplicación de estos dos clones en conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) y también la construcción de VHH bifuncionales para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Medición de la afinidad de VHH mediante interferómetro de biocapa (BLI)

Según los datos de MFI en la **Tabla 10** y los datos de citotoxicidad mostrados anteriormente, se seleccionaron clones E5 y A1 como los principales candidatos y los caracterizaron mediante BLI para medir sus afinidades hacia el antígeno HER2. Los datos de BLI mostraron que las afinidades de los clones A1 y E5 hacia HER2 fueron de 1,3 nM y 724 pM, respectivamente (**FIG. 7A-7B**). En general, los datos de BLI muestran que los clones E5 y A1 tienen una afinidad muy alta y después de unirse a HER2 no se disocian.

Evaluación de la aplicación de los VHH en imágenes celulares

Al enterarse de que los VHH seleccionados no eran tóxicos para las células, se evaluó su aplicación como herramienta para la obtención de imágenes celulares. Para ello, se sembraron células SKOV-3 y se estudió a lo largo del tiempo mediante un microscopio confocal la unión e internalización de los VHH en las células. Los resultados de este experimento mostraron que tanto los clones A1 como E5 comenzaron a internalizarse transcurrido un mínimo de 1 hora y el proceso de internalización se completa en 3-5 horas (**FIG. 8A-8B**). Los datos publicados muestran que el trastuzumab se une e internaliza en las células cancerosas HER2+ en un mínimo de 4 horas (13). Estos resultados muestran la aplicación de los VHH desarrollados para obtener imágenes de células HER2+ positivas.

En general, los ejemplos anteriores demuestran la eficacia de los anticuerpos de dominio

único del presente documento, incluidos los VHH anti-HER2, en diversos métodos de análisis y obtención de imágenes. HER2 es un receptor que frecuentemente se sobreexpresa en una variedad de tumores sólidos agresivos y sus lesiones metastásicas y, como resultado, se ha convertido en un objetivo adecuado para estudios preclínicos y clínicos. La presente solicitud y los ejemplos anteriores demuestran que las construcciones de VHH anti-HER2 desarrolladas en la presente solicitud son capaces de unirse a células cancerosas HER2⁺ con afinidad y especificidad alta con una interacción insignificante con las células HER2⁻.

Como los VHH del presente documento se construyen con etiqueta C-myc y His en sus secuencias, los VHH del presente documento se pueden usar en métodos de citometría de flujo, ELISA, imágenes celulares e inmunohistoquímica, y son adecuados para el fenotipado del cáncer *ex vivo*. Teniendo en cuenta que los VHH actuales son muy estables y pueden producirse en *E. coli*, proporcionan una alternativa de bajo coste a los mAbs que se generan y aíslan principalmente a partir de células de mamíferos y animales.

EJEMPLOS – SECCIÓN 2

Materiales y métodos

A continuación, se muestran los materiales utilizados para la generación, el aislamiento y la caracterización de VHH en los siguientes ejemplos. La lista de células, anticuerpos y reactivos usados en los ejemplos que siguen se enumerarán en la **Tabla 11**.

Tabla 11: Lista de materiales utilizados para generar, aislar y caracterizar VHH CD16a.

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Agarosa Ni-NTA	Qiagen (MD, EUA)	30230
Células FreeStyle™ 293-F	Gibco™ (NY, EUA)	R79007
Medio de expresión FreeStyle™ 293	Gibco™ (NY, EUA)	12338018
Agente antiaglomerante (1000X)	Gibco™ (NY, EUA)	0010057AE
Solución de azul tripán, 0,4 %	Gibco™ (NY, EUA)	15250061
Suero fetal bovino	Gibco™ (NY, EUA)	10437028
Kit QIAprep Spin Miniprep	Qiagen (MD, EUA)	27106
Kit QIAquick PCR Purification	Qiagen (MD, EUA)	28106
Kit QIAquick Gel Extraction	Qiagen (MD, EUA)	28704
Conjunto de ADNasa libre de ARNasa	Qiagen (MD, EUA)	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen (MD, EUA)	74104

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
QIAGEN Plasmid Mega Kit	Qiagen (MD, EUA)	12181
Sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ IV	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	18091050
Tinte de gel de ADN seguro SYBR™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	S33102
Agente de amortiguación TAE UltraPure™ DNA Typing Grade™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	24710030
Agente de amortiguación de lisis y extracción RIPA	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	89901
DPBS, sin calcio, sin magnesio	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	14190250
Inhibidor de proteasa AEBSF	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	78431
Agua libre de nucleasas (no tratada con DEPC)	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AM9937
Tubo de reacción rápida MicroAmp™ con tapa	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	4358297
Placa de almacenamiento Deepwell de 96 pocillos Abgene™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AB0932
Sellos de placa adhesiva de ventilación	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AB0718
Medio S.O.C.	Invitrogen™ (MA, EUA)	15544034
Polietilenimina, lineal, MW 25000	PolyScience (PA, EUA)	23966-1
Carbenicilina (disódica)	GoldBio (MO, EUA)	C-103-25
Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Teknova (CA, EUA)	I3325
Histopaque®-1077 (Ficoll)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	10771-500ML
Solución de tripsina-EDTA	MiliporeSigma (MA, EUA)	T4049-100ML
D-(+)-glucosa	MiliporeSigma (MA, EUA)	G8270-1KG
Fago auxiliar resistente a interferencias VCSM13	Integrated Science (VA, USA)	200251
Cubetas de electroporación Gene	Bio-Rad (PA, EUA)	1652083

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Pulser®/MicroPulser™, espacio de 0,1 cm		
Estándares de color duales Precision Plus Protein™	Bio-Rad (PA, EUA)	1610374
Agente de amortiguación de recubrimiento de ELISA	Bio-Rad (PA, EUA)	BUF030C
Sacarosa	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	S7903-1KG
Sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético dihidrato	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	E5134-100G
Solución de sustrato 1-Step™ Turbo TMB-ELISA	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	34022
Escherichia coli (Migula) WK6	ATCC (VA, EUA)	ATCC 47078
Terrific Broth	IBI Scientific (IA, USA)	IB49141
Caldo LB Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49030
Agar LB de Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49100
Nunc MaxiSorp™ de fondo plano	Invitrogen™ (MA, EUA)	44-2404-21
Leche en polvo, descremada (leche desnatada), en polvo	VWR (PA, EUA)	97063-958
Reactivo de proliferación celular WST-1	Abcam (MA, EUA)	11644807001
Tubos de proteína LoBind, limpios para PCR	Eppendorf (MA, EUA)	0030108302
Biosensor de estreptavidina (SA) Octet®	Sartorius (PA, EUA)	18-5019
Sistema Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	154526PK
Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	23225
Enzima de restricción sapI	NEB (MA, EUA)	R0569L
ADN polimerasa de alta fidelidad Q5®	NEB (MA, EUA)	M0491S
Kit de PCR de alta fidelidad Q5®	NEB (MA, EUA)	E0555S
Mezcla de solución de	NEB (MA, EUA)	N0447S

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
desoxinucleótido (dNTP)		
Escalera de ADN de 100 pb Quick-Load® Purple	NEB (MA, EUA)	N0551S
Tinte de carga en gel, morado	NEB (MA, EUA)	B7024S
ADN ligasa T4	NEB (MA, EUA)	M0202L
Escalera de ADN TrackIt™ de 100 pb	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	10488058
Agarosa UltraPure™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	16500100
Medio 2x YT	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	Y2377-250G
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	81260-1KG
Mezcla maestra de PCR verde de inicio en caliente Platinum™ II	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	14001012
Células electrocompetentes TG1	Lucigen (WI, EUA)	60502-2
IgG de cabra anticonejo H&L (FITC)	Abcam (MA, EUA)	ab6717
Anticuerpo antietiqueta HA (HRP)	Abcam (MA, EUA)	ab1190
Anticuerpo de cadena ligera y pesada de IgG de llama	Bethyl (TX, EUA)	A160-100P
Anticuerpo policlonal con etiqueta His, DyLight 680	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	600-444-382
Suero fetal bovino, calificado, Estados Unidos	Gibco™ (NY, EUA)	26140079
Penicilina-estreptomicina (10 000 U/mL)	Gibco™ (NY, EUA)	15140122
Proteína Fc gamma RIIIA/CD16a (F176) humana biotinilada, Avitag™, etiqueta His (verificada por SPR y BLI)	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDA-H82E8-25 ug
Proteína Fc gamma RIIIB/CD16b (NA1) humana biotinilada, His, Avitag™ (verificada por SPR y BLI)	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDB-H82E4-25 ug
Proteína Fc gamma RIIIB/CD16b	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDB-H82Ea-25 ug

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
(NA2) humana biotinilada, His, Avitag™ (verificada por SPR y BLI)		
MEM α, sin nucleósidos	Gibco™ (NY, EUA)	12561056
Suero fetal bovino, calificado, Estados Unidos	Gibco™ (NY, EUA)	26140079
Suero de caballo, de origen neozelandés	Gibco™ (NY, EUA)	16050122
mio-inositol	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	I7508-100G
Ácido fólico	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	F8758-5G
Penicilina-estreptomicina (10 000 U/mL)	Gibco™ (NY, EUA)	15140122
Ácido acético (17,48 M)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	A6283-100ML
DPBS, sin calcio, sin magnesio	Gibco™ (NY, EUA)	14190144
Fracción V de albúmina bovina (solución al 7,5 %)	Gibco™ (NY, EUA)	15260037
Solución de ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	H9892-100ML
IL-2 humana recombinante sin animales	Peptotech (NJ, EUA)	AF-200-02-250UG
2-mercaptoetanol	Gibco™ (NY, EUA)	21985023
Filtros de jeringa de 0,2 µm con carcasa acrílica	VWR (PA, EUA)	28145-501
Línea de células retrovirales genéticamente modificadas (NK-92®) transducida para expresar CD16 de ser humano	ATCC (VA, EUA)	PTA-8836
Neutrófilos	HemaCare (CA, EUA)	PB011C-1
CD16b de ratón PE antihumano	BD Bioscience (NJ, EUA)	550868
Medio RPMI-1640	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	R8758-6X500ML
Anticuerpo monoclonal CD16 (3G8), grado funcional, eBioscience™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	16-0166-82

Expresión y purificación de la proteína CD16a

VectorBuilder (IL, EUA) sintetizó el gen que codifica el ectodominio CD16a (UniProt ID

P08637) y luego lo clonó en un vector de expresión de mamífero bajo el promotor de EF-1 α . El vector de expresión de mamífero se seleccionó porque el ectodominio de CD16a es una proteína glicosilada. Se diseñó una secuencia señal secretora en el extremo N del gen y una etiqueta 12xhis (SEQ ID NO: 2) en su extremo C para facilitar la purificación de la proteína a partir de los medios de cultivo mediante cromatografía en columna de Ni-NTA (**Tabla 12**). Para expresar CD16a, se cultivaron células FreeStyle™ 293-F según las recomendaciones del fabricante y luego se colocaron a 4×10^5 células/ml en un centrifugador reutilizable de 250 mL. Las células se pasaron cada tres días. El día de la transfección, las células se colocaron a $\sim 3 \times 10^6$ células/ml en 100 ml de medio de expresión FreeStyle™ 293 usando un matraz giratorio reutilizable de 250 mL durante 30 min. Luego se formó un complejo con el vector de expresión CD16a y polietilenimina (PEI). Cada 10^6 células, se mezcló 1 μ g de plásmido con 4 μ g de PEI (relación 1:4 p/p) en Opti-MEM I y se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 20 minutos. A continuación, se añadieron por goteo los complejos plásmido:PEI a las células colocadas con agitación constante. El matraz se incubó a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 h. Al día siguiente, se añadió el doble de medio FreeStyle fresco a las células transfectadas. La expresión de proteínas continuó durante 8-10 días, o hasta que la viabilidad cayera por debajo del 85 %, cualquiera de estas opciones que ocurriera primero. El proceso posterior comenzó con la recolección de las células utilizando 10 000 g, 10 min, 4 °C. El sobrenadante se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m para eliminar los restos celulares. A continuación, se lavaron 300 μ L de resina Ni-NTA con agente de amortiguación de equilibrio (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, pH 7,4), se mezclaron con el sobrenadante y luego se incubaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la mezcla sobrenadante:Ni-NTA se vertió en una columna de cromatografía y se lavó usando 20 mL de agente de amortiguación de lavado (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 7,5 mM, pH 7,4). Finalmente, se eluyó la proteína CD16a recombinante (rCD16a) utilizando 500 μ L de agente de amortiguación de elución (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 250 mM, pH 7,4). La pureza y el peso molecular de la proteína purificada se estimaron mediante SDS-PAGE.

Tabla 12: Secuencia de aminoácidos de la proteína cd16 secretora clonada en el plásmido eCD16bac con un peso molecular teórico de 24,56 kDa

Nombre	Secuencia de aminoácidos
rCD16a (Ectodominio)	METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRASLWELQGMRTEDLPKAVVF LEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAA TVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCH SWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGS

	KNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQWELQLEEGPHHHHHHHHHHH H* (SEQ ID NO: 26)
--	--

*Señal secretora (**NEGRITA**) - ectodominio de rCD16a - sitio de proteasa (*cursiva*) etiqueta His (HHHHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 2))

Inmunización de llama con proteína CD16a

5 La inmunización de la llama fue realizada por Capralogics Inc. (Gilbertville, MA). Se inmunizó a una llama hembra mediante seis inyecciones cada dos semanas utilizando rCD16a (500 µg/inyección). El antígeno de interés se mezcló con adyuvante de Freund completo (primera inyección) o incompleto (segunda, tercera y quinta inyección) para maximizar la respuesta inmunitaria. La cuarta y sexta inyección se realizaron utilizando rCD16a sin ningún adyuvante. 10 Después de la cuarta inyección, se recolectaron 50 mL de sangre entera y se confirmó la inmunización mediante ELISA utilizando CD16a comercial (Acrobiosystem, CDA-H82E9-25 ug). Después de la confirmación de la vacunación, se continuó con la inmunización de la llama durante diez semanas más. Cinco días después de la sexta inyección, se extrajeron 600 mL de sangre entera para aislar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés).

15

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

En primer lugar, la sangre entera se diluyó dos veces usando DPBS-FBS al 3 %. La dilución del suero mejora significativamente la recuperación de PBMC. A continuación, se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad. Posteriormente, se colocaron cuidadosamente 20 35 mL de suero diluido en Ficoll (Histopaque®-1077) para no alterar la interfase. Posteriormente, el tubo se centrifugó utilizando un rotor de cubo oscilante a 400 xg durante 45 min con el freno quitado. La capa superior se eliminó con mucho cuidado. Luego se recolectaron PBMC de la interfase no perturbada. Las PBMC recolectadas se transfirieron a un tubo nuevo de 50 mL y se lavaron inmediatamente para eliminar el resto de Ficoll, que es tóxico para las células.

25

Generación de bibliotecas

Después de recolectar y contar las células usando el método de exclusión de azul tripán, se extrajo el ARN total usando el RNeasy Mini Kit, tras lo cual siguió la síntesis de ADNc usando oligo-dT y hexámero aleatorio mediante el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™ IV. 30 Posteriormente, el ADNc generado se usó como plantilla en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés) anidada usando cebadores en la **Tabla 13** y el protocolo de PCR en la

Tabla 14. La primera ronda de PCR se realizó utilizando CALL001 y CALL002. El producto se pasó por gel de agarosa al 1 % y la banda de 700 pb se cortó y se purificó. A continuación, la primera ronda de productos de PCR se aplicó en la segunda ronda de PCR utilizando VHH-inverso y VHH-directo. La banda de 400 pb en gel de agarosa se cortó, se purificó y se clonó en el fagémido pMECS-GG (proporcionado amablemente por el Dr. S. Muyldermans, Bélgica) utilizando el sistema de clonación Golden Gate. Finalmente, se usó el fagémido recombinante para transformar E. coli TG1 (configuración del electroporador: 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω). Se transformaron diez viales de TG1 competentes para mantener la diversidad de la biblioteca. Luego se añadió 1 ml de medio SOC y se transfirió a un tubo de 50 ml. Después de 60 min de incubación a 37 °C, las bacterias se recolectaron a 6000 xg durante 15 min. Los transformantes se seleccionaron en seis matraces de 100 mL de Luria-Bertani (LB) suplementados con carbenicilina a 100 μ g/mL. Las bacterias propagadas se centrifugaron y se volvieron a suspender en 20 mL de medio LB nuevo. Después de añadir glicerol al 15 %, la biblioteca se mantuvo en un congelador a -80 °C.

Tabla 13: Lista de cebadores y secuencias correspondientes utilizaron para producir ADNc de VHH.

Nombre	Secuencia
CALL001	5'- GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3' (SEQ ID NO: 22)
CALL002	5'- GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3' (SEQ ID NO: 23)
VHH-inverso	5'- GATGGGCTCTTCTGTGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG-3' (SEQ ID NO: 24)
VHH-directo	5'-CTAGTGCTCTTCCGCTTGGAGACGGTGACCTGGGT-3' (SEQ ID NO: 25)

Tabla 14: Protocolo de PCR para la amplificación de los cebadores.

Ciclo	Etapas	Temperatura	Tiempo
1 X	Desnaturalización inicial	95C	3 min
35 X	Desnaturalización	95C	1 min
	Hibridación	50 – 60 C	1 min
	Síntesis	72C	1 min
1 X	Extensión definitiva	72C	10 min
1 X		4C	-

Presentación en fagos

Se llevaron a cabo cuatro rondas de presentación en fagos para llegar a una biblioteca de CD16a específica. Primero, se inocularon 2 DO600 nm ($1 \text{ DO}_{600 \text{ nm}} = 2,66 \times 10^9 \text{ células/ml}$) de la biblioteca de llama en 100 mL de LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL. Cuando la DO alcanzó 0,6, se añadieron al cultivo 500 µL del fago auxiliar, VCSM13, y se incubaron a 37 °C sin agitación durante 60 minutos. A continuación, se añadió kanamicina a 50 µg/mL al cultivo y se incubó a 37 °C durante la noche con agitación. Al día siguiente, las bacterias se centrifugaron usando 10 000 xg, 20 min, 4 °C y se añadió PEG-NaCl al 10 % al sobrenadante y se mantuvo en hielo durante 60 - 120 minutos. Finalmente, los fagos recombinantes se recuperaron mediante centrifugación (3000 xg, 20 min, a 4 °C) tras lo cual siguió un lavado en tres etapas usando DPBS.

Los fagos purificados se usaron para unirse a la proteína CD16a en ELISA de fagos policlonales. En este experimento, todas las incubaciones se realizaron a RT y a una velocidad de agitación de 700 rpm, a menos que se indique lo contrario. Para iniciar la inmunoadsorción, se recubrieron 100 µL de estreptavidina (5 µg/mL) en una placa de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa recubierta se lavó una vez usando DPBS y se bloqueó usando leche desnatada al 2 %. A continuación, se agregaron 50 µL de CD16a biotinilado (1 µg/mL) y se incubaron durante 45 min a RT mientras se agitaba, tras lo cual siguió un lavado en tres etapas usando DPBS, Tween 20 al 0,1 % (DPBS-T al 0,1 %). Luego, se agregaron alrededor de 100 µL de fagos recombinantes. Posteriormente, para eliminar los VHH no específicos, la placa se lavó diez veces con DPBS-T al 0,1 % tras lo cual siguieron diez etapas de lavado con DPBS. Finalmente, los agentes de unión se recuperaron utilizando 50 µL de tripsina al 0,25 %. Después de neutralizar la tripsina mediante fluoruro de 4-(2-aminoetil)benceno-1-sulfonilo (AEBSF), se utilizaron 100 µL de fagos para infectar 100 µL de TG1 durante 1 h a 37 °C. Luego, se transfirieron 100 µL de TG1 infectadas a 100 mL de medio LB que contenía carbenicilina a 100 µg/mL y el cultivo bacteriano continuó durante la noche.

Preparación de extracto periplasmático y evaluación de afinidad y especificidad mediante ELISA

Para seleccionar los agentes de unión superiores, se seleccionaron aleatoriamente 190 colonias para cultivarlas en 1 ml de LB suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL y glucosa al 2 % en una placa Deep-Well de 96 pocillos. Para mantener el cultivo oxigenado, se utilizó una placa adhesiva de ventilación para cubrir la placa. Al día siguiente, se inoculó un LB fresco de 1 mL suplementado con carbenicilina a 100 µg/mL con 10 µL de cultivo durante la noche. Después de 4 h,

la expresión se indujo usando isopropil β -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 mM. La expresión continuó durante la noche a 28 °C. Al día siguiente, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (10 000 xg, 7 min, 4 °C). Se descartaron los sobrenadantes y el sedimento se almacenó a -20 °C. A continuación, se preparó el extracto periplasmático utilizando tres ciclos de congelación-descongelación (30 min a -20 °C, 10 min a RT). A continuación, se agregaron 500 μ L de DPBS al sedimento y se colocaron en un agitador durante 30 min. Finalmente, los sobrenadantes (400 μ L) se transfirieron a una nueva placa Deep-Well de 96 pocillos después de la centrifugación (10 000 xg, 30 min, 4 °C). El extracto periplasmático se utilizó en ELISA para encontrar el mejor candidato.

El extracto periplasmático se utilizó en ELISA para encontrar los mejores agentes de unión. En este experimento, todos los lavados se realizaron usando DPBS-T al 0,1 %, los tiempos de incubación fueron de 60 min, las incubaciones a RT y la velocidad de agitación fue de 700 rpm, a menos que se indique lo contrario. Después de cada anticuerpo, la placa se lavó seis veces para eliminar todos los agentes de unión débiles. En primer lugar, la placa se recubrió con 100 μ L de estreptavidina a 5 μ g/mL durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, después de una etapa de lavado, se agregaron 50 μ L de CD16a y CD16b con biotinilación y se incubaron durante 30 minutos. Después de tres etapas de lavado, se agregaron 100 μ L del extracto periplasmático. Para detectar el VHH unido, se añadió el anticuerpo secundario, anticuerpo anti-etiqueta HA con HRP (dilución 1:10 000). Para desarrollar el color, se agregaron 50 μ L de solución de sustrato 1-Step™ Turbo TMB-ELISA y se incubaron en oscuridad durante 15 min. Después de detener la reacción, se realizaron lecturas de la placa con una longitud de onda de 450 nm. Para reducir el mejor candidato a dos, se utilizó en ELISA la dilución en serie del extracto periplasmático de los 20 mejores VHH, como se mencionó anteriormente. Los dos mejores candidatos (clones C1 y E3) se seleccionaron basándose en la DO más alta en la dilución más alta.

Expresión y purificación de VHH seleccionados

Los VHH seleccionados se secuenciaron y luego se clonaron en un vector plasmídico de expresión. Luego, los plásmidos se transformaron químicamente en E. coli WK6. En primer lugar, se seleccionó mediante inmunoelectrotransferencia el transformante de mayor expresión. A continuación, se inocularon 750 mL de Terrific Broth (TB) suplementado con glucosa al 0,1 %, $MgCl_2$ a 1 mM y carbenicilina a 100 μ g/mL en 7,5 mL de cultivo durante la noche. Después de obtener la DO_{600 nm} de 0,6 - 0,8, se añadió IPTG a 0,5 mM para iniciar la expresión. Luego el cultivo se incubó a 28 °C durante la noche. Al día siguiente, las células bacterianas se centrifugaron usando una centrífuga (10 000 xg, 10 min, 4 °C). Luego, los sedimentos se volvieron a suspender en 10 mL de

agente de amortiguación TES (Tris-HCl a 200 mM, pH 8,0, sacarosa a 500 mM, EDTA a 1 mM) y se incubaron a 4 °C durante 1 h mientras se agitaba. Luego, se agregaron 15 mL de agente de amortiguación TES/4 (se agregaron 10 mL de agente de amortiguación TES a 30 mL de agua destilada) y se incubaron a 4 °C durante 45 min mientras se agitaba. A continuación, las células bacterianas se sedimentaron mediante centrifugación (40 000 xg, 4 °C, 30 min). Después de eso, el sobrenadante se cargó en la columna de Ni-NTA. Las proteínas no específicas se lavaron con 30 mL de agente de amortiguación de lavado (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 25 mM, pH 7,4). La proteína purificada se eluyó mediante el uso de agente de amortiguación de elución (NaCl a 500 mM, Na₂HPO₄ a 20 mM, Tris a 50 mM, imidazol a 250 mM, pH 7,4). La calidad y cantidad de la proteína eluida se evaluaron mediante el kit SDS-PAGE y BCA, respectivamente.

Evaluación de la especificidad de VHH mediante ELISA.

Los VHH purificados se sometieron a análisis funcional mediante ELISA y citometría de flujo. Para ELISA, se agregaron 50 µL de CD16a, CD16b-NA1, CD16b-NA2 y CD32b biotinilados a la placa recubierta con estreptavidina y se incubaron durante 45 min a RT. Después del lavado, se agregaron 100 µL de VHH purificados a 100 nM y se incubaron a RT durante 1 h. A continuación, se añadieron 100 µL de anticuerpo secundario anti-etiqueta HA conjugado con HRP. Finalmente, se añadió el sustrato para el desarrollo del color y se leyó la placa utilizando una DO de 450 nm.

Evaluación de la capacidad de los VHH de reconocer células haNK92 CD16a+ mediante citometría de flujo

Para la citometría de flujo, se utilizaron células haNK92 (CD16a+) y neutrófilos (CD16b⁺). Se adquirieron células haNK92 CD16a+ de ATCC y se cultivaron en MEM- α suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 12,5 %, suero de caballo al 12,5 %, mio-inositol a 0,2 mM, ácido fólico a 0,02 mM, penicilina-estreptomina a 100 U/ml, 2-mercaptoetanol a 0,1 mM y IL-2 a 100 U/ml. Las células neutrofílicas humanas se adquirieron en HemaCare y se cultivaron según el protocolo del fabricante. Primero, ambas líneas celulares se recolectaron y se lavaron una vez usando DPBS suplementado con FBS al 2 % (DPBS-FBS al 2 %). Para cada muestra, se tiñeron $0,5 \times 10^6$ células con anticuerpo en hielo durante 60 min. En este experimento, se utilizó el anticuerpo monoclonal 3G8 como control positivo. Este anticuerpo se une tanto a CD16a como a CD16b. Después de lavar tres veces, se añadió el anticuerpo secundario, anticuerpo anti-etiqueta His etiquetado con FITC. Después del lavado, las muestras se procesaron en Cytotflex usando el canal FL2.

Medición de la cinética y afinidad de unión de VHH utilizando el interferómetro de biocapa

Para evaluar la afinidad de unión (KD) y las tasas constantes de asociación (Kasoc) y disociación (Kdisoc) de VHH, se utilizó un interferómetro de biocapa (BLI) del instrumento Octet RED96e (Sartorius) junto con un biosensor de estreptavidina (SA) Octet®. En este experimento se utilizó 3G8 como control positivo. Después de remojar el sensor durante al menos 10 min en DPBS, se cargó CD16a, CD16b NA1 y CD16b NA2 biotinilados en el biosensor de estreptavidina (SA) durante 10 min. A continuación, el sensor se sumergió en el agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) durante 2 min para alcanzar la línea de base. Luego, el sensor se sumergió en pocillos que contenían 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,25 y 0 nM de mAb 3G8 purificado o VHH anti-CD16a durante 5 min (etapa de asociación). Luego, en la etapa de disociación, los pocillos se sumergieron en agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 %) durante 10 min para adquirir datos (**Tabla 15**). Luego, los datos se analizaron utilizando el software Octet Data Analysis HT 11.1. Los sensogramas se restaron de la referencia y se ajustaron al modelo de unión 1:1 y 2:1 para el análisis de los datos. Finalmente, la afinidad y la cinética se analizaron mediante “asociación y disociación”.

Tabla 15: Condiciones experimentales utilizadas para adquirir datos de BLI.

Etapa	Nombre	Tiempo/s	Velocidad de agitación
1	Comprobación de sensores	30	1000
2	Carga (CD16 a 10 µg/mL)	600	1000
3	Línea de base (DPBS + Tween 20 al 0,05 %)	120	1000
4	Asociación	300	1000
5	Disociación (DPBS + Tween 20 al 0,05 %)	600	1000

Resultados y comentarios

Expresión de rCD16a e inmunización de llama

Se diseñó genéticamente rCD16a y se expresó en el sistema de expresión de mamíferos 293-F y luego se purificó. El análisis de SDS-PAGE de la proteína purificada reveló rCD16a con >95 % de pureza (**FIG. 9A**). El peso molecular observado es ~48 kDa, mientras que el peso molecular teórico (esperado) es de 21,83 kDa. La diferencia entre el peso molecular esperado y el observado proviene de cinco sitios de glicosilación en el ectodominio de CD16a. La glicosilación correcta es vital para el pliegue de proteínas y la inmunogenicidad.

Luego, la rCD16a purificada se usó para inmunizar la llama. La extracción de sangre cuatro

semanas después de la inmunización seguida de ELISA mostró una elevación significativa en los niveles de IgG (DO_{450} de 1,6 después de una dilución 1/50 000), lo que indica una potente respuesta inmunitaria al antígeno de rCD16a inyectado. En este experimento, se utilizó suero preinmunización como control negativo. Como se puede observar, el suero de llama inmunizada tuvo un título alto de anticuerpo contra rCD16a en comparación con la preinmunización (**FIG. 9B**). Los datos indican que la concentración de rCD16a que se inyectó fue suficiente para aumentar la respuesta inmunitaria humoral.

Aislamiento de PBMC, generación de bibliotecas, presentación en fagos y cribado de colonias

El día 75 después de la inmunización de la llama, se extrajo sangre, se aislaron PBMC, se generó un ADNc y una biblioteca de fagémidos, que luego se utilizaron en la presentación en fagos. Después de cuatro rondas de presentación en fagos, se seleccionaron 20 colonias y se lisaron para obtener extracto periplasmático. Se seleccionaron los lisados con la afinidad de unión más alta hacia el antígeno CD16a y luego se examinó su especificidad usando ELISA (**FIG. 10A**). Los resultados de estos experimentos revelaron algunos clones de VHH con mayor afinidad de unión hacia CD16a que hacia el antígeno CD16b-NA1 (**FIG. 10B**). Para identificar los candidatos a VHH de alto rendimiento en términos de afinidad de unión, se preparó y utilizó una dilución de 1280 veces de extracto periplasmático para la unión al antígeno CD16a. Los resultados de ELISA mostraron que, excepto los clones A1, A2, E4 y G4, el resto de los VHH tuvieron una afinidad alta de unión; sin embargo, los clones C1 y E3 parecieron ser las construcciones de mayor rendimiento (**FIG. 10C**). Por lo tanto, estos dos VHH se seleccionaron en función de su especificidad y afinidad alta para estudios posteriores.

Expresión y purificación de clones C1 y E3

Los fagémidos que codifican los VHH C1 y E3 se usaron para transformar E. coli WK6 para su expresión en el espacio periplasmático (**Tabla 16**) y después se purificaron. El espacio periplasmático brinda la oportunidad para que los VHH expresados se plieguen adecuadamente. Luego se analizó la pureza de los VHH purificados mediante SDS-PAGE. Los resultados de este experimento mostraron que la pureza de ambos VHH fue >95 % y con el rendimiento de 2 - 3 mg/l de medio de cultivo.

Tabla 16: Secuencias de aminoácidos de los VHH C1 y E3 con afinidad y especificidad hacia CD16a.

Código	Marco 1	CDR1	Marco 2	CDR2	Marco 3	CDR3	Marco 4	Etiqueta
VHH								

C1 (SEQ ID NO 14)	QVQLQESGG GLVQAGGSL RLSCAAS	GRTFR LYR	MGWFRQ APGKERE FVGS	IKMIDG ST	LYGDPVKG RFTISRDNT KFMAYLQM NSLKPEDT AVYYC	ASVSR VTGSY DS	WGQG TQVTV SS	Etiqueta- HA + etiqueta His
E3 (SEQ ID NO 15)	QVQLQESGG GLVQAGGSA RLSCAAS	GRTFR LYR	MGWFRQ APGKERE FVAS	IKMIDG SS	LFGDPVKG RFTISRDNT KFMVYLQM NSLKPEDT AVYYC	ASVSR NTGSW DS	WGQG TQVTV SS	Etiqueta- HA + etiqueta His

Evaluación de la especificidad de los VHH C1 y E3 purificados.

Para determinar la especificidad de los clones C1 y E3 purificados hacia CD16a, primero se realizó un ELISA. Dado que CD16b tiene dos alelos predominantes, incluido el antígeno 1 de neutrófilos humanos (NA1) y NA2 (10), ambos se utilizaron como controles. También se utilizó CD32b y leche desnatada como controles de antígeno. Se utilizó 3G8 y eBioCB16, que son mAb anti-CD16a/b, como controles de anticuerpos. Es de destacar que no hay disponibilidad comercial de un anticuerpo selectivo con respecto a CD16a para usarse como control. Los resultados de ELISA ilustraron que los VHH C1 y E3 se unieron con eficacia al antígeno CD16a sin ninguna interacción significativa con el antígeno CD32b (**FIG. 11**). CD32b es un receptor que se expresa en los linfocitos B y es responsable de inhibir la activación de los linfocitos B. Una de las desventajas de las terapias basadas en mAb es la unión de su región Fc a CD32b, lo que conduce a una actividad disminuida de la inmunidad humoral. Además de CD32b, los VHH C1 y E3 no interactuaron con el antígeno CD16b-NA1, pero sí con el antígeno CD16b-NA2 (**FIG. 11**).

En la siguiente etapa, se evaluó la especificidad de los VHH C1 y E3 mediante citometría de flujo. En este experimento, se utilizaron linfocitos NK92 (CD16a⁺), neutrófilos (CD16b⁺) y linfocitos B (CD32b⁺) como controles celulares. Se utilizó mAb 3G8 (anti-CD16a/b) y AT10 (anti-CD32a/b) como controles de anticuerpos. Los resultados de este experimento mostraron que los VHH C1 y E3 se unieron con eficacia a los linfocitos NK92, pero no a los neutrófilos (**FIG. 12A-12D**). Además, el clon C1 no se unió a los linfocitos B (**FIG. 12E**). Por el contrario, el mAb 3G8 se unió tanto a NK92 como a neutrófilos y AT10 a linfocitos B, de forma no discriminada. Dado que los VHH C1 y E3 solo se unen a los linfocitos NK sin ser drenados por los neutrófilos (4), este resultado tiene una amplia gama de aplicaciones clínicas.

Medición de la afinidad de los VHH mediante BLI

La afinidad y especificidad de los VHH C1 y E3 se cuantificaron mediante BLI (**FIG. 13A-13D**). Los resultados de los datos de BLI mostraron que los VHH C1 y E3 tuvieron una afinidad alta (nivel subnanomolar) hacia CD16a, mientras que sus afinidades hacia CD16b-NA1 eran al menos 100 veces menores. Los datos de mapeo de epítomos mediante BLI también mostraron que el VHH C1 tuvo un sitio de unión diferente en CD16a con respecto a trastuzumab y pertuzumab (**FIG. 13E**). En general, los datos de BLI, ELISA y citometría de flujo mostraron que los VHH C1 y E3 seleccionados interactuaron específicamente con CD16a sin una interacción significativa con CD16b-NA1 y CD32b.

EJEMPLOS: SECCIÓN 3

Materiales y métodos

Materiales utilizados para la producción y caracterización de BiKE E5C1 (BiKE:HER2/CD16a)

La lista de células, anticuerpos y reactivos utilizados en este estudio se enumerarán en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Materiales utilizados para la producción y caracterización de BiKE E5C1

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Solución de azul tripán, 0,4 %	Gibco™ (NY, EUA)	15250061
DPBS, sin calcio, sin magnesio	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	14190250
Placa de almacenamiento Deepwell de 96 pocillos Abgene™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	AB0932
Carbenicilina (disódica)	GoldBio (MO, EUA)	C-103-25
Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Teknova (CA, EUA)	I3325
Solución de tripsina-EDTA	MiliporeSigma (MA, EUA)	T4049-100ML
Estándares de color duales Precision Plus Protein™	Bio-Rad (PA, EUA)	1610374
Agente de amortiguación de recubrimiento de ELISA	Bio-Rad (PA, EUA)	BUF030C
Sacarosa	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	S7903-1KG
Sal disódica de ácido	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	E5134-100G

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
etilendiaminotetraacético dihidrato		
Solución de sustrato 1-Step™ Turbo TMB-ELISA	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	34022
Escherichia coli (Migula) WK6	ATCC (VA, EUA)	ATCC 47078
Terrific Broth	IBI Scientific (IA, USA)	IB49141
Caldo LB Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49030
Agar LB de Miller	IBI Scientific (IA, USA)	IB49100
Nunc MaxiSorp™ de fondo plano	Invitrogen™ (MA, EUA)	44-2404-21
Leche en polvo, descremada (leche desnatada), en polvo	VWR (PA, EUA)	97063-958
Tubos de proteína LoBind, limpios para PCR	Eppendorf (MA, EUA)	0030108302
Biosensor de estreptavidina (SA) Octet®	Sartorius (PA, EUA)	18-5019
Kit de ensayo de proteína BCA Pierce™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	23225
Células electrocompetentes TG1	Lucigen (WI, EUA)	60502-2
IgG de cabra anticonejo H&L (FITC)	Abcam (MA, EUA)	ab6717
Anticuerpo antietiqueta HA (HRP)	Abcam (MA, EUA)	ab1190
Suero fetal bovino, calificado, Estados Unidos	Gibco™ (NY, EUA)	26140079
Penicilina-estreptomina (10 000 U/mL)	Gibco™ (NY, EUA)	15140122
Proteína Fc gamma RIIIA/CD16a (F176) humana biotinilada, Avitag™, etiqueta His (verificada por SPR y BLI)	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDA-H82E8-25 ug
Proteína Fc gamma RIIIB/CD16b (NA1) humana biotinilada, His, Avitag™ (verificada por SPR y BLI)	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDB-H82E4-25 ug
Proteína Fc gamma RIIIB/CD16b (NA2) humana biotinilada, His,	Acrobiosystems (DE, EUA)	CDB-H82Ea-25 ug

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
Avitag™ (verificada por SPR y BLI)		
MEM α, sin nucleósidos	Gibco™ (NY, EUA)	12561056
Suero fetal bovino, calificado, Estados Unidos	Gibco™ (NY, EUA)	26140079
Suero de caballo, de origen neozelandés	Gibco™ (NY, EUA)	16050122
mio-inositol	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	I7508-100G
Ácido fólico	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	F8758-5G
Penicilina-estreptomicina (10 000 U/mL)	Gibco™ (NY, EUA)	15140122
Ácido acético (17,48 M)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	A6283-100ML
Solución de ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	H9892-100ML
IL-2 humana recombinante sin animales	Peptotech (NJ, EUA)	AF-200-02-250UG
2-mercaptoetanol	Gibco™ (NY, EUA)	21985023
Filtros de jeringa de 0,2 µm con carcasa acrílica	VWR (PA, EUA)	28145-501
Línea de células retrovirales genéticamente modificadas (NK-92®) transducida para expresar CD16 de ser humano	ATCC (VA, EUA)	PTA-8836
CD16b de ratón PE antihumano	BD Bioscience (NJ, EUA)	550868
Medio RPMI-1640	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	R8758-6X500ML
Anticuerpo monoclonal CD16 (3G8), grado funcional, eBioscience™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	16-0166-82
Vectores de pET-28a-c(+)	Novagen (MA, EUA)	69864-3
Reactivo de viabilidad de células HS alamarBlue™	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	A50100
Placa de 96 pocillos		
Proteasa WELQut (5 U/µL)	Thermo Scientific™ (MA, EUA)	EO0861
Proteína Her2/ErbB2 humana	AcroBiosystem (DE, EUA)	HE2-H82E2-25ug

Artículo	Proveedor	N.º de catálogo
biotinilada, His, Avitag™		
Trastuzumab (Trazimera TM, Pfizer)	Cancer Institute of New Jersey Pharmacy Store	N/A
Pertuzumab (Perjeta TM, Genentech)	Cancer Institute of New Jersey Pharmacy Store	N/A
Células de cáncer de mama BT-474	ATCC (VA, EUA)	HTB-20™
Células de cáncer de mama SK-BR-3	ATCC (VA, EUA)	HTB-30™
Células de cáncer de ovario SKOV-3	ATCC (VA, EUA)	HTB-77™
Medio Hybri-Care	ATCC (VA, EUA)	46-X
DMEM/F-12, suplemento GlutaMAX™	Gibco™ (NY, EUA)	10565018
Insulina (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	I0516-5ML
Medio 5A (modificado) de McCoy	Gibco™ (NY, EUA)	16600108
Medio RPMI-1640	Sigma-Aldrich (MA, EUA)	R8758-6X500ML
Proteína Her2/ErbB2 humana biotinilada, His, Avitag™	AcroBiosystem (DE, EUA)	HE2-H82E2-25ug
E. coli SHuffle® T7 Express Competent	New England Biolab™ (MA, EUA)	C3029J

Expresión y purificación de BiKE E5C1

La construcción BiKE E5C1 se sintetizó y luego se clonó en el vector de expresión de pET28a mediante GenScript (Piscataway, NJ). El plásmido se transformó químicamente en *E. coli* SHuffle® T7 Express Competent. En primer lugar, se seleccionó mediante inmunoelectrotransferencia el transformante de mayor expresión. A continuación, se inocularon 750 mL de Terrific Broth (TB) con carbenicilina a 100 µg/mL en 50 mL de cultivo durante la noche. Después de obtener la DO_{600 nm} de 2,5 - 3, se añadió IPTG a 1 mM para iniciar la expresión. Luego el cultivo se incubó a 37 °C durante 7 h. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron usando una centrífuga (10 000 xg, 10 min, 4 °C). El sedimento se almacenó a -20 °C durante la noche. Al día siguiente, los sedimentos se volvieron a suspender en 3 mL por gramo de sedimento usando agente de amortiguación de purificación basal (NaCl a 1 M, KCl a 100 mM, Tris a 50 mM, agente de amortiguación de fosfato a 20 mM, Tween 20 al 0,01 %, imidazol a 15 mM, pH 8) y se incubaron a 4 °C durante 30 min mientras se agitaba. Posteriormente, la suspensión bacteriana se sometió a sonicación (5 s de activación, 3 s de desactivación, 70 % de amplitud) durante 30 min en hielo. A continuación, los desechos celulares se sedimentaron mediante centrifugación (40 000 xg, 4 °C, 30 min). Después de eso, el

sobrenadante se cargó en la columna de Ni-NTA. Las proteínas no específicas se lavaron con 30 mL de agente de amortiguación de lavado (NaCl a 500 mM, KCl a 100 mM, Tris a 100 mM, agente de amortiguación de fosfato a 20 mM, imidazol a 25 mM, pH 8). Para eluir BiKE E5C1, en primer lugar, las resinas se equilibraron con 20 mL de agente de amortiguación de elución basal (NaCl a 500 mM, KCl a 100 mM, Tris a 100 mM, agente de amortiguación de fosfato a 20 mM, sacarosa al 7 %, Tween 20 al 0,01 %, pH 8). Finalmente, las proteínas se eluyeron utilizando 20 U/mL de proteasa WELQut. La calidad y cantidad de la proteína eluida se evaluaron mediante el kit SDS-PAGE y BCA, respectivamente. El peso molecular del BiKE purificado y su estado monomérico se evaluó en las instalaciones centrales del Rutgers Center for Advanced Biotechnology and Medicine mediante cromatografía de líquidos/espectroscopia de masas (LC-MS).

Tabla 18: Secuencia de aminoácidos del BiKE E5C1 (SEQ ID NO: 20) clonado en el plásmido pET28a con un peso molecular teórico de 33,48 kDa. Se diseñó una etiqueta C-myc e his en el extremo C, respectivamente.

VHH anti-HER2 (E5)	Enlazador de HMA	VHH anti-CD16 (C1)	Sitio de proteasa	Etiquetas
QVQLQESGGGLVQAG GSLRLDCAASGRTLSS YVVGWFRQAPGKERE VVAAGWSRTSTFYTDS VKGRFTISRDNENTVY LQMNSLKP EDTAVYYC AADSSPRRW DRESDF GSWGQGTQVTVSS	PSGQAGA AASESLF VSNHAS	QVQLQESGGGLVQAG GSLRLSCAASGRTFRL YRMGWFRQAPGKERE FVGSIKMIDGSTLYGDP VKGRFTISRDN TKFMAY LQMNSLKP EDTAVYYC ASVSRVTGSYDSWGQ GTQVTVSS	WELQ	GSEQKLIS EEDLHHH HHHHHHH HH*

Evaluación de la especificidad de VHH mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

Los BiKE E5C1 y VHH monovalentes purificados, E5 y C1, se sometieron a análisis funcional mediante ELISA y citometría de flujo. Para ELISA, se agregaron 50 µL de CD16a con biotilación a la placa recubierta con estreptavidina y se incubaron durante 45 min a RT. Después del lavado, se agregaron 100 µL de la dilución en serie de 10 veces, de 1000 a 0 nM, de VHH/BiKE purificados y se incubaron a RT durante 1 h. A continuación, se añadieron 100 µL de anticuerpo secundario antietiqueta cMyc conjugado con HRP (diluciones 1:10 000). Finalmente, después del lavado, se añadió el sustrato para el desarrollo del color y se leyó la placa utilizando una DO de 450 nm.

Evaluación de la capacidad de los VHH/BiKE E5C1 de reconocer células haNK92 CD16a+ mediante citometría de flujo

Para la citometría de flujo, se adquirieron células haNK92 CD16a⁺ de ATCC y se cultivaron en MEM- α suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 12,5 %, suero de caballo al 12,5 %, mioinositol a 0,2 mM, ácido fólico a 0,02 mM, penicilina-estreptomicina a 100 U/ml, 2-mercaptoetanol a 0,1 mM y IL-2 a 100 U/ml. En primer lugar, se recolectaron NK92 CD16a⁺ y se lavó una vez usando solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS, por su sigla en inglés) suplementada con FBS al 2 % (DPBS-FBS al 2 %). A continuación, todas las células se fijaron usando paraformaldehído al 3,7 % durante 20 min a RT, tras lo cual siguió un lavado en dos veces. Para cada muestra, se tiñeron $0,5 \times 10^6$ células con una dilución en serie de 10 veces, de 1000 a 0 nM de VHH/BiKE purificados durante 60 min a RT. Después de lavar tres veces, se añadió el anticuerpo secundario, anticuerpo anti-etiqueta His etiquetado con FITC. Después del lavado, las muestras se procesaron en Cytotflex usando el canal FL1.

Medición de la cinética y afinidad de unión de VHH y BiKE E5C1 utilizando BLI

Para evaluar la afinidad de unión (K_D) y las tasas constantes de asociación (K_{asoc}) y disociación (K_{disoc}) de VHH y BiKE, se utilizó un interferómetro de biocapa (BLI) de Octet RED96e (Sartorius) ubicado en la Biophysics Core Facility de la Universidad de Princeton. Se empapó un biosensor de estreptavidina (SA) Octet® durante al menos 10 min en DPBS suplementado con caseína al 0,1 %, se cargaron antígenos CD16a, CD16b-NA1, CD16b-NA2 y HER2 biotinilados en el biosensor de estreptavidina (SA) hasta que se alcanzó un desplazamiento de 1 nm. A continuación, el sensor se sumergió en el agente de amortiguación de lavado (DPBS + Tween 20 al 0,05 % + caseína al 0,1 %) durante 2 min para alcanzar la línea de base. Luego, el sensor se sumergió en pocillos que contenían 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875 y 0 nM de BiKE o VHH anti-CD16a purificados durante 5 min (etapa de asociación). Luego, en la etapa de disociación, los sensores se sumergieron en el agente de amortiguación de lavado durante 5 min para adquirir datos (Tabla 5). Luego, los datos se analizaron utilizando el software Octet Data Analysis HT 11.1. Los sensogramas se restaron de la referencia y se ajustaron al modelo de unión 1:1 para el análisis de los datos. Finalmente, la afinidad y la cinética se analizaron mediante “asociación y disociación”.

Evaluación de ADCC mediante un ensayo de toxicidad celular

La capacidad de BiKE de inducir ADCC se evaluó y se comparó con los mAb trastuzumab y/o pertuzumab. En este experimento, las células cancerosas objetivo (es decir, SKOV-3, BT474 y JIMT-1) estaban en condiciones adherentes o no adherentes. Para realizar ADCC en condiciones

adherentes, se colocaron 10^4 células cancerosas en una placa de 96 pocillos tratada con cultivo de tejidos. Al día siguiente, se añadió a las células 100 nM o 10 pM de BiKE o mAb y esto se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron células laNK92 o haNK92 a las células objetivo para obtener relaciones E:T de 4, 2, 1, 0,5, 0,25 y 0 y se incubaron durante cuatro horas a 37 °C. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces usando DPBS para eliminar los linfocitos NK92. Finalmente, se añadió a la placa un reactivo de viabilidad celular HS alamarBlue™ al 10 % y se incubó durante una o dos horas a 37 °C. Luego, la placa se leyó utilizando el lector de placas Tecan Infinite M Plex y se calculó la viabilidad celular.

Para realizar ADCC en condiciones no adherentes (en suspensión), se mezclaron 5×10^3 células cancerosas objetivo con 100 nM de mAb o BiKE y luego se agregaron a una placa de 96 pocillos no tratada. Luego, se agregaron diferentes cantidades de células haNK92 a cada pocillo para obtener relaciones E:T de 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0. La placa se incubó a 37 °C durante cuatro horas. A continuación, se añadió el reactivo de viabilidad celular HS alamarBlue™ y se incubó a 37 °C durante dos o tres horas. Por último, la placa se leyó mediante un lector de placas Tecan Infinite M Plex y se calculó la viabilidad celular mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$[(\text{Intensidad fluorescente del grupo de prueba} - \text{Intensidad fluorescente solo de NK}) / (\text{Intensidad fluorescente solo de células objetivo})] \times 100$$

Evaluación de la liberación de citocinas y proteínas citotóxicas de linfocitos NK92 durante ADCC

Se colocaron células SKOV-3 en una placa de 96 pocillos tratada con cultivo de tejidos con una densidad de 10 000 células por pocillo. Al día siguiente, se añadió BiKE o trastuzumab a 10 nM a la placa y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron células efectoras (laNK92 o haNK92) en una relación E:T de 4. Después de dos horas (perforina y granzima B) y 24 h (TNF- α e IFN- γ), las placas se centrifugaron a 2000 g durante 10 min para sedimentar las células. Luego, el sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos no tratada. La cantidad de liberación de citocinas se cuantificó utilizando el kit Quantikine ELISA y el kit Perforin Human ELISA siguiendo el protocolo del fabricante. Los datos se presentan como media $\pm$ DE (n=3).

Cuantificación de la desgranulación utilizando CD107a emergido (LAMP-1)

En primer lugar, se colocaron 10^4 células SKOV-3 en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se añadió una dilución en serie de BiKE y trastuzumab en el intervalo de 0 a 100 nM y se incubó durante 30 min a 37 °C. Luego, se añadió laNK92 (GFP⁺) o haNK92 en una relación E:T de 4 y la placa se incubó a 37 °C durante dos horas. A continuación,

se añadió bloqueador de Fc a la placa y se incubó a 37 °C durante una hora más. Posteriormente, se añadió el anticuerpo anti-CD107a conjugado con APC y se incubó durante una hora en una incubadora. Finalmente, la placa se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron dos veces para eliminar el exceso de anticuerpos y los datos se adquirieron mediante el citómetro Beckman Coulter CytoFLEX. Para el análisis de los datos, se reguló la GFP⁺ (laNK92) para distinguir entre células efectoras y objetivo. A continuación, se cuantificó el CD107a emergido en la población de células GFP⁺.

Resultados y comentarios

Construcción de BiKE E5C1 y caracterización

Usando ingeniería recombinante, se construyó *BiKE E5C1* fusionando VHH anti-CD16a C1 con VHH anti-HER2 E5 a través de un enlazador semiflexible de HMA (**FIG. 14A**). Para simplificar, la construcción se mostrará como BiKE E5C1. Los datos de SDS-PAGE mostraron que el BiKE E5C1 purificado tuvo una pureza superior al 95 %, mientras que el gráfico de LC-MS mostró que el BiKE purificado estaba libre de dímeros o multímeros (**FIG. 14B-14C**). Luego, se evaluó la unión de BiKE E5C1 hacia los antígenos CD16a y HER2 mediante ELISA y citometría de flujo. Se utilizaron como controles VHH anti-CD16a C1 y VHH anti-HER2 E5. El análisis estadístico de los datos (ELISA y citometría de flujo) mostró que la afinidad del BiKE E5C1 hacia los antígenos CD16a y HER2 permaneció intacta y la fusión de los dos VHH a través del enlazador de HMA no impactó negativamente en sus uniones a los antígenos CD16a y HER2 (prueba t, $p > 0,05$) (**FIG. 15A-15D**).

Medición de la afinidad de unión de BiKE E5C1 mediante BLI

Se midió la afinidad y especificidad del BiKE E5C1 mediante BLI. Los resultados de este experimento mostraron que BiKE E5C1 retuvo no solo su afinidad alta hacia CD16a, sino también su afinidad baja hacia los antígenos CD16b-NA1 (**FIG. 16A-16C**). Estos resultados confirmaron que la afinidad y especificidad de la construcción de BiKE hacia CD16a y CD16b-NA1 se mantuvieron sin cambios.

Evaluación de la capacidad de BiKE E5C1 y haNK92 para destruir células cancerosas HER2⁺ en suspensión

Para determinar si BiKE E5C1 puede facilitar el reconocimiento y la destrucción de las células cancerosas HER2⁺ en suspensión, que representan células cancerosas en circulación, por parte de células haNK92, se realizó un ensayo de ADCC en condiciones no adherentes (**FIG. 17A**). En este

experimento, se colocaron células cancerosas y células haNK92 en placas no adherentes, tras lo cual siguió la adición de BiKE E5C1, trastuzumab o trastuzuamb. Los resultados de este estudio mostraron que BiKE E5C1 ayudó a la destrucción de las células cancerosas HER2⁺ por parte de las células haNK92 con mayor eficacia que el trastuzumab y pertuzumab (**FIG. 17B-17D**). La **FIG. 17A** muestra una representación esquemática de la citotoxicidad celular dirigida por anticuerpos, en la que BiKE, trastuzumab y pertuzumab no solo activan los linfocitos NK, sino que también facilitan el reconocimiento de las células cancerosas objetivo por parte de los linfocitos NK.

Medición de ADCC y liberación de proteínas efectoras utilizando BiKE E5C1, laNK92 y haNK92

Para determinar si BiKEE5C1 proporciona una ventaja en términos de ADCC sobre el mejor mAb anti-HER2 actualmente disponible (es decir, trastuzumab), se realizó un ensayo de toxicidad celular. Como células efectoras se utilizaron tanto células laNK92 (F176) como haNK92 (V176). Se ha demostrado que CD16a (V176) tiene una afinidad relativamente mayor hacia la región Fc de los mAb. Se colocaron líneas de células cancerosas HER2⁺ SKOV-3, BT474 y JIMT-1 en condiciones adherentes y se utilizaron como células objetivo. Primero, las células cancerosas se trataron con células laNK92 solas, laNK92 más trastuzumab (equivalente a 100 nM) y laNK92 más BiKE E5C1 (equivalente a 100 nM), tras lo cual siguió una medición de la viabilidad celular. Los resultados de este experimento mostraron que el trastuzumab aumentó significativamente la citotoxicidad de las células laNK92 en la mayoría de las relaciones E:T; sin embargo, en las tres líneas celulares analizadas, la ADCC de BiKE E5C1 fue superior a la del trastuzumab (**FIG. 18A-18C**). Manteniendo la relación E:T de 4 en la que tanto el trastuzumab como BiKE E5C1 pudieron destruir más del 90 % de las células cancerosas, medimos la ADCC utilizando anticuerpos de diferentes concentraciones. Los resultados de este experimento mostraron que el BiKE E5C1 fue aproximadamente 100 veces más potente que el trastuzumab (**FIG. 18D-18F**). Para evaluar si la muerte de las células cancerosas se debió a la estimulación de las células laNK92 por parte de los BiKE, medimos las concentraciones de proteínas citotóxicas y citocinas, lo cual incluyó perforina, granzima B, IFN- γ y TNF- α durante el experimento de ADCC. En el presente documento, utilizamos células SKOV-3 como células objetivo ya que nuestros datos junto con la literatura anterior han demostrado que las células SKOV-3 tienen una expresión limitada de ligandos de NKG2D (es decir, MICA/B) en sus superficies. Como resultado, la probabilidad de estimulación de células laNK92 a través de ligandos NKG2D en células SKOV-3 (en ausencia de BiKE) se reduce significativamente. Los resultados de este experimento mostraron que el BiKE desempeñó un papel importante en la estimulación de las células laNK92 para liberar proteínas citotóxicas y citocinas a velocidades considerablemente mayores que el trastuzumab (**FIG. 18G-18K**). La mayor tasa de estimulación de laNK92 con BiKE E5C1 explica la

mayor tasa observada de ADCC en las células cancerosas que fueron tratadas con laNK92 más BiKE E5C1 en comparación con las tratadas con laNK92 más trastuzumab. Como se esperaba, los datos también mostraron que la incubación de células laNK92 con SKOV-3 (sin BiKE) tuvo un efecto limitado sobre la liberación de proteínas citotóxicas y citocinas (**FIG. 18G-18K**).

5 Para determinar si el BiKE E5C1 proporciona una ventaja en términos de ADCC por sobre el trastuzumab en pacientes con linfocitos NK (V176) de afinidad alta, se realizó un ensayo de toxicidad celular utilizando haNK92 (V176). Se colocaron células cancerosas HER2⁺ en condición adherente como se mencionó anteriormente y se trataron con células haNK92 solas, haNK92 más trastuzumab (equivalente a 100 nM) o haNK92 más BiKE E5C1 (equivalente a 100 nM), tras lo cual siguió una
10 medición de la viabilidad celular. Las células cancerosas también se trataron en las mismas condiciones con una relación E:T fija utilizando diferentes concentraciones de anticuerpos. Los resultados de estos experimentos mostraron que la ADCC con el BiKE E5C1 fue superior a la del trastuzumab no solo en diferentes proporciones E:T (**FIG. 19A-19C**), sino también en diferentes concentraciones (**FIG. 19D-19F**). La medición de la liberación de proteínas efectoras también mostró
15 que BiKE E5C1 activa las células haNK92 de manera más significativa que el trastuzumab (**FIG. 19G-19K**).

Para determinar si el BiKE E5C1 proporciona una ventaja en términos de ADCC por sobre el trastuzumab más pertuzumab en pacientes con linfocitos NK (F176) de afinidad baja, se realizó un ensayo de toxicidad celular utilizando laNK92. Se sembraron células cancerosas SKOV-3 HER2⁺ en
20 condiciones adherentes como se mencionó anteriormente y se trataron con células laNK92 solas, laNK92 más trastuzumab (equivalente a 10 pM), laNK92 más pertuzumab (equivalente a 10 pM), laNK92 más BiKE E5C1 (equivalente a 10 pM), laNK92 más trastuzumab más pertuzumab (equivalente a 10 pM cada uno, 20 pM en total), laNK92 más BiKE E5C1 más trastuzumab (equivalente a 10 pM cada uno, 20 pM en total), o laNK92 más BiKE E5C1 más pertuzumab
25 (equivalente a 10 pM cada uno, total de 20 pM) tras lo cual siguió la medición de la viabilidad celular. Los resultados de este experimento mostraron que BiKE E5C1 por sí solo proporcionó un nivel significativamente mayor de ADCC en comparación con trastuzumab, pertuzumab o trastuzumab más pertuzumab (**FIG. 20**).

De acuerdo con una o más modalidades, se establecerán ejemplos de anticuerpos de
30 dominio único, métodos y usos en los siguientes ítems:

Ítem 1. Una construcción, que comprende:

un primer anticuerpo de dominio único, que tiene una secuencia de aminoácidos de una de 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, un parásito o un virus,

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

Ítem 2. La construcción del ítem 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, EGFR, VEGFR, CD47, FGFR, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de tumor de vejiga (BTA),
 10 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, marcadores epiteliales y mesenquimales de células tumorales en circulación, fosfatasa ácida prostática (PAP),
 15 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 coriónica humana-beta, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2
 20 (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, pl85erbB2, pl80erbB-3, nm-23HI, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, beta-catenina,
 25 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.

Ítem 3. La construcción del ítem 1, donde el antígeno está asociado a bacterias, y donde el antígeno
 30 se selecciona dentro del grupo que consiste en polisacáridos o antígenos peptídicos asociados a P. aeruginosa, S. aureus, Clostridium difficile, Acinetobacter baumannii y Klebsiella pneumonia.

Ítem 4. La construcción del ítem 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.

Ítem 5. La construcción del ítem 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

5 estrongiloidiasis.

Ítem 6. La construcción del ítem 1 o ítem 2, 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.

Ítem 7. La construcción del ítem 1 o ítem 2, donde el segundo anticuerpo de dominio único

10 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

Ítem 8. La construcción del ítem 7, donde las células cancerosas que expresan HER2 son células de cáncer de ovario, células de cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, células

15 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.

Ítem 9. La construcción de cualquiera de los ítems 1-8, donde la secuencia de aminoácidos del primer anticuerpo de dominio único muestra una afinidad alta hacia el receptor de CD16a de los

20 linfocitos NK.

Ítem 10. La construcción del ítem 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.

Ítem 11. La construcción de cualquiera de los ítems 1-10, donde el primer y segundo anticuerpo de

25 dominio único están fusionados con un enlazador.

Ítem 12. La construcción del ítem 11, donde el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA).

Ítem 13. La construcción de cualquiera de los ítems 1-12, que comprende además al menos un anticuerpo de dominio único adicional que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra afinidad

30 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.

Ítem 14. La construcción del ítem 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.

Ítem 15. La construcción del ítem 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.

Ítem 16. Un anticuerpo de dominio único, que comprende:

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.

Ítem 17. Un anticuerpo de dominio único, que comprende:

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.

Ítem 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 los ítems 6-8, donde la construcción activa los linfocitos NK en el sujeto para reconocer células cancerosas HER2 positivas objetivo en el sujeto.

Ítem 19. Un método para realizar un ensayo de ELISA usando un anticuerpo de dominio único del ítem 16 o ítem 17 o una construcción de cualquiera de los ítems 1-15, el método comprende:

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 secundario está enlazado a una enzima y está configurado para reconocer el anticuerpo de dominio único;

añadir una sustancia que contiene un 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.

Ítem 20. Un método para realizar un ensayo de citometría de flujo usando un anticuerpo de dominio único del ítem 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+.

Ítem 21. Un método de obtención de imágenes celulares que utiliza el anticuerpo de dominio único del ítem 17, el método comprende:

- 5 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
10 presencia o ausencia de expresión de HER2 en la superficie de las células cancerosas sospechosas.

Ítem 22. El método del ítem 21, donde el anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente es un anticuerpo antietiqueta his o un anticuerpo antietiqueta C-myc.

- Ítem 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 del ítem
15 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
20 identificar la ubicación anatómica de los linfocitos NK en la imagen.

Ítem 24. El método del ítem 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 Ítem 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 del ítem 17;
 realizar un método de obtención de imágenes de tumores del sujeto para producir una
30 imagen; e
 identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en la imagen.

Ítem 26. El método del ítem 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).

Ítem 27. El anticuerpo de dominio único del ítem 17, donde el anticuerpo de dominio único comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Ítem 28. El anticuerpo de dominio único del ítem 17, donde el anticuerpo de dominio único
5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Ítem 29. El anticuerpo de dominio único del ítem 17, donde el anticuerpo de dominio único comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Ítem 30. El anticuerpo de dominio único del ítem 17, donde las células cancerosas que expresan HER2 son células de cáncer de ovario que expresan HER2.

10 Ítem 31. El anticuerpo de dominio único del ítem 30, donde las células de cáncer de ovario que expresan HER2 son de una lesión metastásica.

Ítem 32. El anticuerpo de dominio único del ítem 17, donde las células cancerosas que expresan HER2 son células de cáncer de mama, 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
15 o cualquier otra célula cancerosa con expresión de HER2.

Ítem 33. Una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico, que comprende:
un primer anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos de una de
SEQ ID NO: 14 y 15;

un segundo anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos de una de
20 SEQ ID NO: 3-11,

donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí con o sin un enlazador, y donde la construcción muestra especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b.

25 Ítem 34. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 33, 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.

Ítem 35. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 34, donde
30 el primer y segundo anticuerpo de dominio único están fusionados con un enlazador.

Ítem 36. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 35, donde el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA).

Ítem 37. Una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico, que comprende:
una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, donde la construcción presenta

especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a en la superficie de linfocitos citolíticos naturales (NK) y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b.

Ítem 38. Un método para realizar un ensayo de ELISA usando un anticuerpo de dominio único de cualquiera de los ítems 16, 17 y 27-32, el método comprende:

- 5 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
- 10 secundario está enlazado a una enzima y está configurado para reconocer el anticuerpo de dominio único;
 añadir una sustancia que contiene un 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
- 15 antígenos, la reacción posterior produce una señal detectable en la muestra.

Ítem 39. El método del ítem 38, donde el anticuerpo secundario es un anticuerpo antietiqueta his, un anticuerpo antietiqueta C-myc o un anticuerpo antietiqueta HA.

Ítem 40. El método del ítem 38, donde la enzima es peroxidasa de rábano picante (HRP, por su sigla en inglés).

- 20 Ítem 41. El método del ítem 38, donde la señal detectable es un cambio de color.

Ítem 42. Un método para realizar un ensayo de citometría de flujo usando un anticuerpo de dominio único de cualquiera de los ítems 17 y 27-32, el método comprende:

- suspender una muestra que contiene células cancerosas y el anticuerpo de dominio único en un líquido;
- 25 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+.

- 30 Ítem 43. Un método para realizar un ensayo de citometría de flujo usando un anticuerpo de dominio único del ítem 16, el método comprende:

 suspender una muestra que contiene linfocitos NK 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 los linfocitos NK son linfocitos NK CD16a+.

- 5 Ítem 44. El método del ítem 42 o 43, donde el anticuerpo secundario es un anticuerpo antietiqueta his, un anticuerpo antietiqueta C-myc o un anticuerpo antietiqueta HA.

Ítem 45. Un método de obtención de imágenes celulares usando el anticuerpo de dominio único de cualquiera de los ítems 17 y 27-32, el método comprende:

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

- 10 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.

- 15 Ítem 46. El método del ítem 45, donde el anticuerpo secundario es un anticuerpo antietiqueta his o un anticuerpo antietiqueta C-myc.

Ítem 47. Un método de fenotipado de cáncer *ex-vivo* mediante inmunohistoquímica, el método usa el anticuerpo de dominio único de cualquiera de los ítems 17 y 27-32, y el método comprende:

crioseccionar el tejido tumoral sospechoso y fijar el tejido tumoral sospechoso en un

- 20 portaobjetos;

teñir el tejido sospechoso con el anticuerpo de dominio único;

aplicar un anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente;

realizar fotomicrografía usando un microscopio para detectar la presencia o ausencia de expresión de HER2 en el tejido tumoral sospechoso.

- 25 Ítem 48. El método del ítem 47, donde el anticuerpo secundario con etiquetado fluorescente es un anticuerpo antietiqueta his o un anticuerpo antietiqueta C-myc.

Ítem 49. 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 del ítem 16, el método comprende:

- 30 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.

Ítem 50. El método del ítem 49, donde el método de obtención de imágenes de todo el cuerpo es la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Ítem 51. El método del ítem 49, donde el método de obtención de imágenes de todo el cuerpo es la tomografía por emisión de positrones (PET).

5 Ítem 52. El método del ítem 49, donde el método de obtención de imágenes de todo el cuerpo es la tomografía computarizada (CT).

Ítem 53. El método del ítem 49, donde el método de obtención de imágenes de todo el cuerpo es la tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT).

10 Ítem 54. 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 cualquiera de los ítems 17 y 27-32;

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

15 identificar lesiones cancerosas que expresan HER2 en la imagen.

Ítem 55. El método del ítem 54, donde el método de obtención de imágenes de tumores es la obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Ítem 56. El método del ítem 54, donde el método de obtención de imágenes de tumores es la tomografía por emisión de positrones (PET).

20 Ítem 57. El método del ítem 54, donde el método de obtención de imágenes de tumores es la tomografía computarizada (CT).

Ítem 58. El método del ítem 54, donde el método de obtención de imágenes de tumores es la tomografía computarizada por emisión monofotónica (SPECT).

Ítem 59. Una construcción para tratar cánceres HER2 positivos, la construcción comprende:

25 una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 33-37; y

linfocitos citolíticos naturales (NK) que expresan un receptor de CD16a para activar el anticuerpo de dominio único,

30 donde la construcción muestra una actividad significativa contra el cáncer hacia los cánceres HER2 positivos.

Ítem 60. Un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto, el método comprende:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de la construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 33-37, y linfocitos citolíticos naturales (NK) que expresan un receptor de CD16a para activar el anticuerpo de dominio único.

Ítem 61. Un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto, el método comprende:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de la construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 33-37, donde la construcción de anticuerpo de dominio único activa los linfocitos NK en el sujeto para reconocer células cancerosas HER2 positivas
5 objetivo en el sujeto.

Ítem 62. Una construcción, que comprende:

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

10 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, un parásito o un virus,

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

15 Ítem 63. La construcción del ítem 62, 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, 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,
20 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, 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
25 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 coriónica humana-beta, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CAIX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, 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
30 (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-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.

5 Ítem 64. La construcción del ítem 62, 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*.

10 Ítem 65. La construcción del ítem 62, 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.

Ítem 66. La construcción del ítem 62, 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 Ítem 67. La construcción del ítem 62 o ítem 63, 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.

20 Ítem 68. La construcción del ítem 62 o ítem 63, 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

25 Ítem 69. La construcción del ítem 68, 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.

Ítem 70. La construcción de cualquiera de los ítems 62-69, donde la secuencia de aminoácidos del primer anticuerpo de dominio único muestra una afinidad alta hacia el receptor de CD16a de los linfocitos NK.

30 Ítem 71. La construcción del ítem 62, 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.

Ítem 72. La construcción de cualquiera de los ítems 62-71, donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único están fusionados con un enlazador.

Ítem 73. La construcción del ítem 72, donde el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA).

Ítem 74. La construcción de cualquiera de los ítems 62-73, 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.

Ítem 75. La construcción del ítem 74, donde el al menos un anticuerpo de dominio único adicional donde es el mismo tipo de anticuerpo que el primer anticuerpo de dominio único.

Ítem 76. La construcción del ítem 74, donde el al menos un anticuerpo de dominio único adicional donde es el mismo tipo de anticuerpo que el segundo anticuerpo de dominio único.

Ítem 77. Un anticuerpo de dominio único, que comprende:

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 macrófagos, sin reactividad cruzada con CD16b-NA1 o CD32b.

Ítem 78. 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 los ítems 67-69, donde la construcción activa los linfocitos NK en el sujeto para reconocer células cancerosas HER2 positivas objetivo en el sujeto.

Ítem 79. Una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico, que comprende:

un primer anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 14 y 15;

un segundo anticuerpo de dominio único que tiene una secuencia de aminoácidos de una de SEQ ID NO: 3-11,

donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único se fusionan entre sí con o sin un enlazador, y donde la construcción muestra especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a en la superficie de los macrófagos y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b.

Ítem 80. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 79, 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.

Ítem 81. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 80, donde el primer y segundo anticuerpo de dominio único están fusionados con un enlazador.

Ítem 82. La construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico del ítem 81, donde

el enlazador es un enlazador de aldolasa muscular humana (HMA).

Ítem 83. Una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico, que comprende:

una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, donde la construcción presenta especificidad y afinidad alta hacia el receptor de CD16a en la superficie de macrófagos y HER2, sin reactividad cruzada con CD16b (p. ej., CD16b-NA1) o CD32b.

Ítem 84. Una construcción para tratar cánceres HER2 positivos, la construcción comprende:

una construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 79-83; y

macrófagos que expresan un receptor de CD16a para activar el anticuerpo de dominio único, donde la construcción muestra una actividad significativa contra el cáncer hacia los cánceres HER2 positivos.

Ítem 85. Un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto, el método comprende:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de la construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 79-83, y macrófagos que expresan un receptor de CD16a para activar el anticuerpo de dominio único.

Ítem 86. Un método para inhibir cánceres HER2 positivos en un sujeto, el método comprende:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de la construcción de anticuerpo de dominio único de carácter biespecífico de cualquiera de los ítems 79-83, donde la construcción de anticuerpo de dominio único activa los macrófagos en el sujeto para reconocer células cancerosas HER2 positivas objetivo en el sujeto.

Referencias:

1. Barb AW. Fc gamma receptor compositional heterogeneity: Considerations for immunotherapy development. J Biol Chem. 2021;296:100057.

2. Chenoweth AM, Wines BD, Anania JC, Mark Hogarth P. Harnessing the immune system via FcgammaR function in immune therapy: a pathway to next-gen mAbs. Immunol Cell Biol. 2020;98(4):287-304.

3. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. Blood. 1997;90(3):1109-14.

4. Treffers LW, van Houdt M, Bruggeman CW, Heineke MH, Zhao XW, van der Heijden J, et al. FcgammaRIIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. Front Immunol. 2018;9:3124.

5. Ocana-Guzman R, Vazquez-Bolanos L, Sada-Ovalle I. Receptors That Inhibit Macrophage Activation: Mechanisms and Signals of Regulation and Tolerance. J Immunol Res.

2018;2018:8695157.

6. Morris AB, Farley CR, Pinelli DF, Adams LE, Cragg MS, Boss JM, et al. Signaling through the inhibitory Fc receptor FcγRIIB induces CD8+ T cell apoptosis to limit T cell immunity. *Immunity*. 2020;52(1):136-50. e6.
- 5 7. Arezumand R, Alibakhshi A, Ranjbari J, Ramazani A, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for targeting angiogenesis in solid cancers. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1746.
8. Ackaert C, Smiejewska N, Xavier C, Sterckx YG, Denies S, Stijlemans B, et al. Immunogenicity risk profile of nanobodies. *Frontiers in immunology*. 2021;12:578.
9. Allegra A, Innao V, Gerace D, Vaddinelli D, Allegra AG, Musolino C. Nanobodies and cancer:
10 current status and new perspectives. *Cancer investigation*. 2018;36(4):221-37.
10. Roberts JT, Barb AW. A single amino acid distorts the Fc gamma receptor IIIb/CD16b structure upon binding immunoglobulin G1 and reduces affinity relative to CD16a. *J Biol Chem*. 2018;293(51):19899-908.
11. Nomani A, Li G, Yousefi S, Wu S, Malekshah OM, Nikkhai SK, et al. Gadolinium-labeled affibody-
15 XTEN recombinant vector for detection of HER2+ lesions of ovarian cancer lung metastasis using quantitative MRI. *Journal of Controlled Release*. 2021;337:132-43.
12. Malekshah OM, Sarkar S, Nomani A, Patel N, Javidian P, Goedken M, et al. Bioengineered adipose-derived stem cells for targeted enzyme-prodrug therapy of ovarian cancer intraperitoneal metastasis. *Journal of Controlled Release*. 2019;311:273-87.
- 20 13. Li JY, Perry SR, Muniz-Medina V, Wang X, Wetzel LK, Rebelatto MC, et al. A biparatopic HER2-targeting antibody-drug conjugate induces tumor regression in primary models refractory to or ineligible for HER2-targeted therapy. *Cancer cell*. 2016;29(1):117-29.

Todas las publicaciones, las patentes y los documentos de patentes se incorporan al
25 presente documento mediante referencia, como si se incorporaran individualmente mediante referencia. Los solicitantes pretenden que esta declaración de incorporación mediante referencia, de conformidad con 37 CFR §1.57(b)(1), se relacione con todas y cada una de las publicaciones, solicitudes de patente o patentes individuales, cada una de las cuales está claramente identificada de conformidad con 37 CFR §1.57(b)(2), incluso si dicha cita no está precedida o sucedida
30 inmediatamente por una declaración de constitución específica por referencia. La inclusión de declaraciones específicas de incorporación mediante referencia, si las hubiera, dentro de la memoria descriptiva no debilita de ninguna manera esta declaración general de incorporación mediante referencia. No se pretende que la cita de las referencias en el presente documento sea una admisión de que la referencia es el estado de la técnica pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto

al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos. No ha de interpretarse ninguna limitación incoherente con la presente descripción a partir de esto.

La invención se ha descrito con referencia a diversas modalidades y técnicas específicas y preferidas. Sin embargo, debe entenderse que se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones sin dejar de estar dentro del espíritu y alcance de la invención.

Si bien se han descrito modalidades específicas anteriormente con referencia a las modalidades y los ejemplos divulgados, esas modalidades son solo ilustrativas y no limitan el alcance de la invención.