

**ACTIVADORES DE LINFOCITOS CITOLÍTICOS NATURALES (NK) QUE SE UNEN A LAS
VARIANTES DE NKp46 Y BCMA CON GENOMANIPULACIÓN DE FC**

ANTECEDENTES

El antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA, por sus siglas en inglés) se ha visto implicado en la progresión de varios cánceres de linfocitos B (por ejemplo, mieloma múltiple) y enfermedades o trastornos de linfocitos B (por ejemplo, amiloidosis de cadena ligera o LCA, por sus siglas en inglés), al expresarse en linfocitos B maduros y células tumorales derivadas de linfocitos B. Por lo tanto, el BCMA es una diana atractiva para la terapia contra el cáncer de linfocitos B y la terapia para enfermedades o trastornos relacionados con los linfocitos B. No obstante, muchas terapias existentes dirigidas a BCMA, tales como los activadores de linfocitos T anti CD3xBCMA, provocan potentes problemas de toxicidad, tales como la liberación excesiva de citocinas proinflamatorias.

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) son una subpoblación de linfocitos que participan en la inmunidad innata. Los linfocitos NK proporcionan un mecanismo de inmunovigilancia eficaz mediante el cual se pueden eliminar células no deseadas, tales como células tumorales o infectadas por virus. Las características y propiedades biológicas de los linfocitos NK incluyen la expresión de antígenos de superficie, incluyendo CD16, CD56 y/o CD57, la ausencia del complejo TCR α/β o γ/δ en la superficie celular, la capacidad de unirse a células y destruirlas de una manera no restrictiva del MHC y, en particular, células que no expresan antígenos MHC/HLA "propios" mediante la activación de enzimas citolíticas específicas, la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando para receptores activadores de NK, y la capacidad de liberar moléculas proteicas llamadas citocinas que estimulan la respuesta inmunitaria. El interés en torno a los linfocitos citolíticos naturales (NK) ha ido creciendo debido a sus posibles propiedades antitumorales.

Existe la necesidad en la técnica de terapias anti BCMA potentes con perfiles de seguridad manejables. Las proteínas de unión anti BCMA x NKp46, reivindicadas en el presente documento, satisfacen esta necesidad.

SUMARIO

La divulgación se refiere a proteínas de unión multifuncionales que comprenden un primer y un segundo dominios de unión a antígeno (ABD, por sus siglas en inglés) y la totalidad o parte de una región Fc de inmunoglobulina o una variante de la misma, en donde el primer ABD se une específicamente a BCMA humano y el segundo ABD se une específicamente a NKp46 humano, y en donde la totalidad o parte de la región Fc de inmunoglobulina o una variante de la misma se une a un receptor Fc- γ humano. Particularmente, los activadores NKp46-BCMA divulgados tienen una amplia genomanipulación de Fc que mejora la actividad ADCC (a través de la unión de CD16 (Fc γ R1IIa) a la región constante (Fc) de anticuerpos) y/o la semivida sérica.

Los activadores NKp46-BCMA divulgados muestran una fuerte potencia a través de la doble activación de NK con NKp46 y CD16, con un buen perfil de seguridad (liberación mínima de citocinas proinflamatorias en comparación con una modalidad de activador de linfocitos T (TCE, por sus siglas en inglés)) y una semivida sérica prolongada.

La divulgación también se refiere a métodos para elaborar dichas proteínas de unión, composiciones de las mismas y sus usos.

En un aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión que comprende un primer dominio de unión a antígeno (ABD) con especificidad de unión a BCMA y un segundo ABD con especificidad de unión a NKp46, en donde:

(a) el primer ABD comprende: (a1) un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y (a2) un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX¹SSTGX²VTPX³X⁴YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X¹ es R o A, X² es T o A, X³ es S o G, y X⁴ es N o Y, una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX⁵X⁶PP (SEQ ID NO: 5), en donde X⁵ es S, I o N y X⁶ es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX⁷X⁸GX⁹QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X⁷ es W o Y, X⁸ es F o Y y X⁹ es N o G; y

(b) el segundo ABD comprende especificidad de unión a NKp46.

En determinadas realizaciones, (b) el segundo ABD comprende:

(b1) un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH2) que comprende:

- una secuencia HCDR1 que comprende DYVIN, una secuencia HCDR2 que comprende EIYPGSGTNYNEKFKA, y una secuencia HCDR3 que comprende RGRYGLYAMDY; - una secuencia HCDR1 que comprende GYTFSDYVIN (SEQ ID NO: 19), una secuencia HCDR2 que comprende EIYPGSGTN (SEQ ID NO: 20), y una secuencia HCDR3 que comprende RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21); - una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 22), una secuencia HCDR2 que comprende YITYSGSTSYNPSLES (SEQ ID NO: 23), y una secuencia HCDR3 que comprende GGYYGSSWGVFAY (SEQ ID NO: 24); - una secuencia HCDR1 que comprende EYTMH (SEQ ID NO: 25), una secuencia HCDR2 que comprende GISPNIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 26), y una secuencia HCDR3 que comprende RGGSFDY (SEQ ID NO: 27); - una secuencia HCDR1 que comprende SFTMH (SEQ ID NO: 28), una secuencia HCDR2 que comprende YINPSSGYTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 29), y una secuencia HCDR3 que comprende GSSRGFDY (SEQ ID NO: 30); o - una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 31), una secuencia HCDR2 que comprende YITYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 32), y una secuencia HCDR3 que comprende CWDYALYAMDC (SEQ ID NO: 33); y

(b2) un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL2) que comprende:

- una secuencia LCDR1 que comprende RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 34), una secuencia LCDR2 que comprende YTSRLHS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia LCDR3 que comprende QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36); - una secuencia LCDR1 que comprende RVSENIYSYLA (SEQ ID NO: 37), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 38), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYGTPWT (SEQ ID NO: 39); - una secuencia LCDR1 que comprende RASQSISDYLH (SEQ ID NO: 40), una secuencia LCDR2 que comprende YASQSIG (SEQ ID NO: 41), y una secuencia LCDR3 que

comprende QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 42); - una secuencia LCDR1 que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 43), una secuencia LCDR2 que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 44), y una secuencia LCDR3 que comprende QHFWGTPRT (SEQ ID NO: 45); o - una secuencia LCDR1 que comprende RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 46), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 47), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYDTPLT (SEQ ID NO: 48).

En determinadas realizaciones, el VL1 comprende: - una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 8), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 9); - una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 10), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 12); - una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 13), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNIKPP (SEQ ID NO: 14), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 15); o - una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 16), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNKPP (SEQ ID NO: 17), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALYGGQWV (SEQ ID NO: 18).

En determinadas realizaciones: - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50; - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51; - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52; - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o - el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de

En determinadas realizaciones: - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69; - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; o - el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende además la totalidad o parte de un dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo. En determinadas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, el dominio Fc de IgG1 es un dominio Fc de IgG1 humana. En determinadas realizaciones, la totalidad o parte del dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo se une a un receptor Fc-γ humano. En determinadas realizaciones, la totalidad o parte del dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo se une a un polipéptido CD16A (FcγRIII) humano.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc comprende un glucano natural en la posición aminoacídica 297, de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión está N-glucosilada.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc o una variante del mismo comprende una primera cadena pesada Fc y una segunda cadena pesada Fc.

En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado mediado por un par de cisteínas (C) que sustituyen a: (i) una leucina (L) en la posición aminoacídica 242 y una lisina (K) en la posición aminoacídica 334; o (ii) una arginina (R) en la posición aminoacídica 292 y una valina (V) en la posición aminoacídica 302; en donde las posiciones aminoacídicas son de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones, la primera cadena pesada Fc o la segunda cadena pesada Fc comprenden el par de cisteínas. En determinadas realizaciones, la primera y la segunda cadenas pesadas Fc comprenden cada una el par de cisteínas. En determinadas realizaciones, la primera y la segunda cadenas pesadas Fc comprenden cada una las sustituciones L242C/K334C. En determinadas realizaciones, la primera y la segunda cadenas pesadas Fc comprenden cada una las sustituciones R292C/V302C.

En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende una sustitución en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU. En determinadas realizaciones, la sustitución en la posición aminoacídica 332 es un ácido glutámico (E).

5 En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende además una o más sustituciones en las posiciones aminoacídicas 236, 239 o 330, de acuerdo con la numeración EU. En determinadas realizaciones, la sustitución en la posición aminoacídica 236 es una alanina (A). En determinadas realizaciones, la sustitución en la posición aminoacídica 239 es un ácido aspártico (D). En determinadas realizaciones, la sustitución en la posición aminoacídica 330 es una leucina (L).

10 En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende además un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239 y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU. En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende además una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239 y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU. En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende además una alanina (A)
15 en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330 y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende al menos dos cadenas polipeptídicas que forman al menos dos sitios de unión a antígeno, en donde al menos una cadena
20 polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VL1-L1-VL2-L2-CL [I];

y al menos una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VH2-L3-VH1-L4-CH1 [II];

en donde:

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina; y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende tres cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VL1-L1-VL2-L2-CL [I];

una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VH2-L3-VH1-L4-CH1-bisagra-CH2-CH3 [III]; y

una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

bisagra-CH2-CH3 [IV]

en donde:

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina;

CH2 es un dominio constante de cadena pesada CH2 de inmunoglobulina;

5 CH3 es un dominio constante de cadena pesada CH3 de inmunoglobulina;

bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios CH1 y CH2;

y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

10 en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado.

En determinadas realizaciones: (a) L1, L2, L3 y L4 tienen cada uno independientemente cero aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS, GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 83), GQPKAAP (SEQ ID NO: 84) y GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 85); o (b) L1, L2, L3 y L4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS, GGGGSGGGSGGGGS, S, RT, TKGPS, GQPKAAP y GGS GSSGSGG.

En determinadas realizaciones, L1 y L2 comprenden cada uno la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGS. En determinadas realizaciones, L3 y L4 están cada uno ausentes.

20 En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende: (i) una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (ii) una segunda cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (iii) una tercera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno (ABD) con especificidad de unión a BCMA y un segundo ABD con especificidad de unión a NKp46, en donde: (a) el primer ABD comprende un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y (b) el segundo ABD comprende un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH2) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL2) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

En determinadas realizaciones: el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y el VH2 comprende

una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

5 En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende: (i) una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (ii) una segunda cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (iii) una tercera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno (ABD) con especificidad de unión a BCMA y un segundo ABD con especificidad de unión a NKp46, en donde la proteína de unión comprende: (i) una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; (ii) una segunda cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73; y (iii) una tercera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión descrita anteriormente es para su uso como un medicamento.

15 En determinadas realizaciones, la proteína de unión descrita anteriormente es para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión descrita anteriormente es para su uso en un método para el tratamiento o prevención de un cáncer.

20 En determinadas realizaciones, la proteína de unión descrita anteriormente es para su uso en un método para el tratamiento o prevención del mieloma múltiple.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión descrita anteriormente es para su uso en un método para el tratamiento o prevención de amiloidosis de cadena ligera (LCA).

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión descrita anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento o prevención la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una primera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una segunda cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una tercera cadena polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula aislada que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente.

5 En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula aislada que comprende el vector de expresión descrito anteriormente. En determinadas realizaciones, la célula es una célula de mamífero.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para elaborar la proteína de unión, que comprende cultivar la célula aislada en condiciones adecuadas y recuperar la proteína de unión.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para elaborar la proteína de unión descrita anteriormente, que comprende una etapa de: (a) cultivar una o más células hospedadoras en condiciones adecuadas para expresar una pluralidad de polipéptidos recombinantes, comprendiendo dicha pluralidad (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, y (ii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, y (iii) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74; (b) opcionalmente, recuperar los polipéptidos
15 recombinantes expresados.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión producida por el método de elaboración descrito anteriormente. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica descrita anteriormente.

20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir un cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir el mieloma múltiple, que comprende a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica descrita anteriormente. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple resistente al tratamiento. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple asintomático.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la amiloidosis de cadena ligera (LCA), que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica descrita anteriormente. En determinadas realizaciones, la LCA es LCA recidivante. En determinadas realizaciones, la LCA es LCA resistente al tratamiento.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para restaurar o potenciar la actividad de células que expresan NKp46 en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para eliminar células neoplásicas en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para desencadenar o aumentar la lisis mediada por linfocitos NK de células neoplásicas en un paciente que lo necesite, que comprende

administrar al paciente la composición farmacéutica descrita anteriormente. En determinadas realizaciones, las células neoplásicas expresan BCMA.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inducir la eliminación de células neoplásicas por los linfocitos NK en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente la composición farmacéutica descrita anteriormente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno (ABD) con especificidad de unión a BCMA y un segundo ABD con especificidad de unión a NKp46.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión comprende además la totalidad o parte de un dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo, opcionalmente, en donde: la totalidad o parte del dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo se une a un receptor Fc-γ humano; la totalidad o parte del dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo se une a un polipéptido CD16a (FcγRIIIa) humano; el dominio Fc comprende un glucano nativo en la posición aminoacídica 297, de acuerdo con la numeración EU; y/o la proteína de unión está N-glucosilada.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc o una variante del mismo comprende una primera cadena pesada Fc y una segunda cadena pesada Fc. En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado mediado por un par de cisteínas (C) que sustituyen a: (i) una leucina (L) en la posición aminoacídica 242 y una lisina (K) en la posición aminoacídica 334; o (ii) una arginina (R) en la posición aminoacídica 292 y una valina (V) en la posición aminoacídica 302; en donde las posiciones aminoacídicas son de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones, la primera y la segunda cadenas pesadas Fc comprenden cada una las sustituciones L242C/K334C. En determinadas realizaciones, la primera y la segunda cadenas pesadas Fc comprenden cada una las sustituciones R292C/V302C.

En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende una sustitución en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU, opcionalmente, en donde la sustitución en la posición aminoacídica 332 es un ácido glutámico (E), que comprende opcionalmente, además al menos una cadena pesada Fc comprende además una o más sustituciones en las posiciones aminoacídicas 236, 239 o 330, de acuerdo con la numeración EU, opcionalmente, en donde la sustitución en la posición aminoacídica 236 es una alanina (A), la sustitución en la posición aminoacídica 239 es un ácido aspártico (D), y la sustitución en la posición aminoacídica 330 es una leucina (L).

En determinadas realizaciones, al menos una cadena pesada Fc comprende además un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU; al menos una cadena pesada Fc comprende además una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU; o al menos una cadena pesada Fc comprende además una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características y ventajas anteriores y otras de la presente divulgación se entenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones ilustrativas tomadas junto con los dibujos adjuntos.

5 Las **figura 1A-figura 1B** son esquemas de activadores de linfocitos NK multispecíficos NKp46 (NKCE). La **figura 1A** es una representación de un NKp46 NKCE que se une con un brazo a un antígeno en la superficie de la célula tumoral (por ejemplo, BCMA) y con otro brazo al receptor NKp46 en los linfocitos NK. El dominio Fc del NKCE también se une a CD16 en el linfocito NK. La **figura 1B** representa un formato de NKp46-BCMA NKCE distinto que activa BCMA en la superficie de la célula tumoral mientras que también recluta linfocitos NK a través de la doble activación de NKp46 y un receptor Fcγ, CD16a, induciendo la actividad ADCC con un formato competente para Fc mejorado. El formato competente para Fc mejorado (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "CODV-OL1-ADE-DSB") incluye: (1) mutaciones ADE (G236A/S239D/I332E) en CH2 para mejorar la actividad ADCC; (2) DSB (R292C/V302C) en CH2 para la estabilización térmica y productividad (por ejemplo, capacidad de expresión en células y rendimiento general); (3) mutaciones botón en ojal (KIH, por sus siglas en inglés) en CH3 para favorecer la formación de heterodímeros en Fc - (3a) botón (en la cadena pesada que contiene los dominios VH/VL): S354C/T366W y (3b) ojal (en la cadena pesada que carece de los dominios VH/VL): Y349C/T366S/L368A/Y407V; y (4) mutaciones RF (H435R/Y436F) en CH3 para favorecer la purificación de heterodímeros en Fc. La numeración de aminoácidos de todos los dominios Fc es según EU. Este NKp46-BCMA NKCE_Fc CODV-OL1-ADE-DSB contiene además dos enlazadores GGGGSGGGGS en la cadena ligera: uno entre VL anti BCMA y VL anti NKp46 y entre VL NKp46 y CL. Sitio de unión de NKp46: 3D9; sitio de unión de BCMA: CA10v7; unión de CD16 a través del dominio Fc competente para ADCC.

La **figura 2A** es un gráfico de barras que representa la densidad de BCMA en un panel de líneas celulares de mieloma múltiple en función de la emisión de fluorescencia FITC de la superficie celular. La **figura 2B** es la tabla correspondiente que registra la densidad de BCMA en cada línea celular clasificada en orden descendente.

La **figura 3A** es una valoración representativa de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en células RPMI 8226. Los datos de valoración mostrados son la intensidad de fluorescencia media en un intervalo de dosis de concentración de anticuerpo. Se indican los valores de CE₅₀ de 5 valoraciones independientes. La **figura 3B** es una valoración representativa de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en linfocitos NK humanos purificados a partir de PBMC de voluntarios sanos. Los datos de valoración mostrados son la intensidad de fluorescencia media en un intervalo de dosis de concentración de anticuerpo. Se indican los valores de CE₅₀ de 3 donantes de NK.

La **figura 4** es una tabla que muestra las afinidades de unión (medidas en KD) de 12 formatos Fc distintos de NKp46-BCMA-NKCE a dos variantes distintas de CD16a humana (que llevan una valina (V) o una fenilalanina (F) en la posición de aminoácido 176) según lo cuantificado mediante resonancia de plasmón superficial (SPR).

La **figura 5** es una tabla que muestra las afinidades de unión (medidas en KD) de 12 formatos Fc distintos de NKp46-BCMA-NKCE al receptor Fc neonatal humano (FcRn) según lo cuantificado mediante SPR.

La **figura 6** es un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* que compara las citotoxicidades de NKp46-BCMA-NKCE, con ADCC mejorada (Fc-DE, Fc-DE-DSB, Fc-ADE y Fc-ADE-DSB) y ADCC no mejorada (NKp46-BCMA_Fc) a concentraciones crecientes (nM) incubadas con células RPMI 8226 en presencia de linfocitos NK en reposo purificados de seis donantes diferentes (D410, D700, D114, D974, D245 y D409). Se usaron células RPMI 8226 como dianas y los linfocitos NK en reposo purificados se usaron como efectores.

La **figura 7** es un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* que compara las citotoxicidades de NKp46-BCMA_Fc-ADE, NKp46-BCMA_Fc, Referencia 1, BCMA_IgG1, IC_IgG1-DE y NKp46-IC_Fc de control a concentraciones crecientes (nM) incubados con células RPMI 8226 o MM.1s en presencia de linfocitos NK en reposo purificados de dos donantes distintos (D611 y D222). Se usaron células RPMI 8226 y MM.1s como dianas y los linfocitos NK en reposo purificados se usaron como efectores.

La **figura 8** es un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* que compara las citotoxicidades de NKp46-BCMA_Fc-ADE, Referencia 1, BCMA_IgG1 y NKp46-IC_Fc-ADE de control a concentraciones crecientes (nM) incubados con células RPMI 8226 en presencia de linfocitos NK en reposo purificados de tres donantes distintos (D786, D371 o D695). Se usaron células RPMI 8226 como dianas y los linfocitos NK en reposo purificados se usaron como efectores.

La **figura 9** es un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* que compara las citotoxicidades de NKp46-BCMA_Fc-ADE y NKp46-IC_Fc-ADE usando linfocitos NK en reposo purificados frente a células RPMI 8226. Se usaron células RPMI 8226 como dianas y se cargaron linfocitos NK en reposo purificados (panel izquierdo) o células RPMI 8226 (panel derecho) con ^{51}Cr para determinar tanto la destrucción de células diana como la toxicidad fratricida de NK frente a NK en el mismo ensayo. (Se muestran 2 donantes de linfocitos NK).

La **figura 10** es un ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* que compara la citotoxicidad del NKp46-BCMA-NKCE en presencia de diversas concentraciones de BCMA soluble. Actividades citotóxicas de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB frente a células RPMI 8226, en presencia de concentraciones crecientes de proteína recombinante BCMA soluble (0, 2, 20 y 200 ng/ml). Se usaron RPMI 8226 como dianas y linfocitos NK en reposo purificados como efectores (se muestran 2 donantes de linfocitos NK, D504 y D930).

La **figura 11** ilustra que la activación óptima de linfocitos NK implica el doble direccionamiento de NKp46 y CD16a mediante NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB.

La **figura 12** demuestra que la alta potencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB permite una alta eficiencia en la destrucción de células tumorales, incluso en modelos de células de MM que expresan bajo contenido de BCMA.

La **figura 13** demuestra que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB tiene una potencia mejorada sobre un anticuerpo con características ADCC mejoradas.

La **figura 14A** es un esquema del modelo experimental de ratón para determinar la actividad antitumoral de NKp46-BCMA_Fc *in vivo*. Se inyectó por vía intravenosa (i.v.) una mezcla 1:1 de células RMA de linfoma de ratón fluorescentes verdes (eGFP) y rojas (dsRed) que no expresaban y que expresaban, respectivamente, BCMA humano en ratones deficientes en Rag1 transgénicos para NKp46 humano (Tg huNKp46 Rag1 -/-). Los ratones portadores de tumores (n = 7 para cada grupo) se trataron una vez con una dosis total de 12.2 picomoles de NKp46-BCMA_Fc o vehículo como control. Se realizó una biopsia del hígado de los ratones 48 h después del tratamiento y se monitorizó el recuento absoluto de células RMA infiltradas mediante citometría de flujo como se describe en la **figura 14B-figura 14E**. La **figura 14B** muestra la población mixta de células RMA de linfoma de ratón fluorescentes verdes (eGFP-huBCMA negativas) y rojas (dsRed-huBCMA positivas) analizada por citometría de flujo antes del injerto. La **figura 14C** muestra la expresión de BCMA humano por citometría de flujo de las células RMA de linfoma de ratón fluorescentes verdes (eGFP) y rojas (dsRed). La **figura 14D** muestra la expresión de BCMA humano en células RMA dsRed antes del injerto (*in vitro*) y después del injerto en biopsias de hígado (*ex vivo*) analizada por citometría de flujo. La **figura 14E** muestra el recuento absoluto de células RMA infiltrantes en el hígado (izquierda) y la relación de células dsRed/eGFP (derecha) analizados por citometría de flujo 48 h después del tratamiento. La prueba estadística usada para analizar los datos es la prueba de Mann y Whitney: no significativa (ns) cuando $p > 0.05$; significativa (**) $p < 0.01$.

La **figura 15A** muestra la medición por citometría de flujo del porcentaje de células de mieloma múltiple (MM), definidas como células CD138+ CD38+, y de la expresión de CD107a y CD69 por los linfocitos NK, definidas como células CD3- CD56+ CD16+, después del tratamiento durante una noche de PBMC derivadas de sangre completa de un paciente con MM con 10 µg/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB, o 20 µg/ml del anticuerpo de Referencia 4 (anticuerpo anti CD38 IgG1), o un isotipo de control (NKp46-IC_Fc-ADE-DSB) en un entorno autólogo. El panel izquierdo son diagramas de puntos que muestran la tinción de CD138 y CD38 de PBMC de un paciente con MM y la selección de células (MM) CD138+ CD38+. Los diagramas de contorno del panel central muestran las tinciones de CD107a y CD16 de células CD3- CD56+. Los diagramas de contorno de los paneles derechos muestran las tinciones de CD69 y CD16 de células CD3- CD56+. El gráfico de barras izquierdo de la **figura 15B** representa el porcentaje de células CD38+ CD138+ (MM) entre las PBMC, el gráfico de barras central representa el porcentaje de linfocitos NK CD3- CD56+ CD16+ que expresan CD107a, y el gráfico de barras derecho representa el porcentaje de linfocitos NK CD3- CD56+ CD16+ que expresan CD69, después del tratamiento durante una noche de las PBMC derivadas de sangre completa de un paciente con MM con 10 µg/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (negro), o 20 µg/ml del anticuerpo de Referencia 4 (gris - un anticuerpo anti CD38 IgG1), o un isotipo de control (blanco).

Las **figuras 16A-16C** representan el % de muerte de células de MM en muestras de pacientes tratados *ex vivo* con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB que no han recibido tratamiento o que han experimentado una recidiva después de tratamientos de referencia. TC = clases terapéuticas; ≤4TC: Imid,Dex,PI y anti CD38mAb; >4TC:agentes anteriores y/o agente alquilante, mimético de BH3, y/o BCMA o CD38TCE, y/o mAb anti CD47, y/o inhibidor de histona desacetilasa (HDACi).

La **figura 17** representa la ubicación de los péptidos VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 86), GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 87) y TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 88) en la molécula NKp46-BCMA NKCE_Fc CODV-OL1-ADE-DSB.

5 La **figura 18** representa las concentraciones plasmáticas medias (N = 3) frente al perfil temporal de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE tras una única administración intravenosa (2.5 mg/kg) a ratones transgénicos huFcRn tg32 hembra.

La **figura 19** representa las concentraciones plasmáticas individuales frente al perfil temporal de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE tras una única administración intravenosa (2.5 mg/kg) a ratones transgénicos huFcRn tg32 hembra.

10 La **figura 20** muestra la actividad del anticuerpo biespecífico NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 contra células tumorales EL4-huBCMA diseminadas en ratones huNKp46-Tg x Rag. Los gráficos representan curvas de Kaplan-Meier para animales tratados con el anticuerpo biespecífico NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 a razón de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg frente al compuesto de Referencia 2, NKCE de control invalidado para la unión a CD16 (azul), NKp46 (verde) o BCMA (negro) o el grupo no tratado.

15 La **figura 21** muestra la actividad del anticuerpo biespecífico muNKp46-huBCMA CODV-OL1 Fc WT y FC-ADE sustituto contra células tumorales EL4-huBCMA en ratones huFcR-Tg. Los gráficos representan curvas de Kaplan-Meier para animales tratados con los anticuerpos biespecíficos sustitutos Fc WT y Fc-ADE muNKp46-huBCMA a razón de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg.

20 La **figura 22** representa las curvas de respuesta a la dosis porcentual de la reducción del pico principal de la muestra no reducida por DTT medidas por electroforesis capilar (cGE). mAb ctrl (amarillo), CODV-OL1 wt (azul), CODV-OL1 ADE (magenta), CODV-OL1 ADE-DSB (negro).

La **figura 23** representa curvas de respuesta a la dosis del % de incorporación de NEM/reducción de DSB de CODV-OL1 wt (panel A), CODV-OL1 ADE (panel B), CODV-OL1 ADE-DSB (panel C). Los residuos de cisteína analizados se indican en las leyendas de las figuras con numeración de acuerdo con las proteínas analizadas.

La **figura 24A-figura 24B** representan la citotoxicidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en un cocultivo de linfocitos NK con células RPMI 8226 (**figura 24A**) y la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1-beta, IL-6, TNF-alfa y IFN-gamma) en dicho cocultivo con PMBC (**figura 24B**).

La **figura 25A-figura 25B** representan la proliferación de la línea de células tumorales MM1R en presencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en un cocultivo de linfocitos NK (**figura 25A**) y la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1-beta, IL-6, TNF-alfa y IFN-gamma) en dicho cocultivo con PMBC (**figura 25B**).

La **figura 26A-figura 26D** representan la eficacia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en la activación de linfocitos NK como se indica por los marcadores de activación CD69 (**figura 26A y figura 26C**) y CD107a/b (**figura 26B y figura 26D**) en presencia o ausencia de células de MM RPMI 8226.

La **figura 27A-figura 27F** representan la eficacia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en la producción intracelular de TFN α (**figura 27A y figura 27D**), IFN γ (**figura 27B y figura 27E**) y MIP1 β (**figura 27C y figura 27F**) en linfocitos NK en presencia o ausencia de células de MM RPMI 8826.

La **figura 28A-figura 28B** representan los niveles plasmáticos de IFN- γ (**figura 28A**) y MIP-1 α (**figura 28B**) después del tratamiento con 1, 10, 100 y 300 ug/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos en un ensayo *in vitro* con sangre completa humana cocultivada con células RPMI 8226-FRP.

5 La **figura 29A-figura 29B** representan los niveles plasmáticos de TNF- α (**figura 29A**) e IL-1 β (**figura 29B**) después del tratamiento con 1, 10, 100 y 300 ug/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos en un ensayo *in vitro* con sangre completa humana cocultivada con células RPMI 8226-RFP

10 La **figura 30A-figura 30B** representan los niveles plasmáticos de IL-6 (**figura 30A**) e IL-8 (**figura 30B**) después del tratamiento con 1, 10, 100 y 300 ug/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos en un ensayo *in vitro* con sangre completa humana cocultivada con células RPMI 8226-RFP

15 La **figura 31A-figura 31B** representan los niveles plasmáticos de IL-2 (**figura 31A**) y GM-CSF (**figura 31B**) después del tratamiento con 1, 10, 100 y 300 ug/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos en un ensayo *in vitro* con sangre completa humana cocultivada con células RPMI 8226-RFP.

20 La **figura 32A-figura 32B** representan los niveles plasmáticos de IL-4 (**figura 32A**) e IL-10 (**figura 32B**) después del tratamiento con 1, 10, 100 y 300 ug/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos en un ensayo *in vitro* con sangre completa humana cocultivada con células RPMI 8226-RFP.

La **figura 33A-figura 33C** representan la inducción de la activación de linfocitos NK y el agotamiento de células tumorales con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB *in vitro* y *ex vivo* con muestras primarias de pacientes en el momento del diagnóstico y en la recidiva. La **figura 33A** es el % de muerte de células de MM, la **figura 33B** es el % de células CD107+, y la **figura 33C** es el % de células INF γ +

La **figura 34A-figura 34B** son gráficos que ilustran las concentraciones plasmáticas de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB tras la inyección subcutánea repetida (una vez por semana durante 3 semanas) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en macacos cangrejeros (2/dosis). La **figura 34A** representa las concentraciones plasmáticas en dos machos que recibieron 25000 ug/kg/administración. La **figura 34B** representa las concentraciones plasmáticas en dos hembras que recibieron 50000 ug/kg/administración.

La **figura 35** ilustra los niveles plasmáticos de IL-6 tras la inyección subcutánea repetida (una vez por semana durante 3 semanas) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a razón de 25 mg/kg/administración o 50 mg/kg/administración en macacos cangrejeros (2 por dosis).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La divulgación proporciona proteínas de unión multifuncionales que se unen a un biomarcador de superficie en los linfocitos NK inmunitarios, es decir, NKp46 y un antígeno de interés en la membrana celular de células plasmáticas normales y neoplásicas, es decir, BCMA, y es capaz de redirigir los linfocitos NK para que lisen una célula diana que expresa el biomarcador de superficie de BCMA. Las proteínas de unión multifuncionales de la presente divulgación comprenden además la totalidad o parte de una región Fc o

una variante de la misma que se une a un receptor Fc-γ (FcγR), en particular, un receptor Fc-γ de activación (FcγR), por ejemplo, FcγRIIIa, también denominado CD16a.

La presente divulgación proporciona variantes del dominio Fc novedosas (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosas que comprenden variantes del dominio Fc) que tienen una estabilidad térmica mejorada. La presente divulgación también proporciona variantes del dominio Fc novedosas (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosos que comprenden variantes del dominio Fc) que tienen una unión mejorada a los receptores Fc. La presente divulgación proporciona además variantes del dominio Fc novedosas (por ejemplo, polipéptidos de unión que comprenden variantes del dominio Fc) que comprenden un dominio Fc glucosilado que mejora la interacción con una molécula efectora de anticuerpo en comparación con un dominio Fc de tipo natural (por ejemplo, no modificado). La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican variantes del dominio Fc (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosos que comprenden variantes del dominio Fc), vectores de expresión recombinante y células hospedadoras para elaborar variantes del dominio Fc (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosos que comprenden variantes del dominio Fc), y composiciones farmacéuticas que comprenden las variantes del dominio Fc aisladas (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosos que comprenden variantes del dominio Fc). También se proporcionan métodos para usar las variantes del dominio Fc (por ejemplo, polipéptidos de unión novedosos que comprenden variantes del dominio Fc) de la presente divulgación para tratar una o más enfermedades o trastornos.

Se debe entender que los métodos descritos en esta divulgación no se limitan a métodos particulares y condiciones experimentales divulgados en el presente documento, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante.

Además, los experimentos descritos en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, usan técnicas biológicas e inmunológicas moleculares y celulares convencionales dentro de la capacidad de la técnica. Dichas técnicas se conocen bien por el experto y se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2008), incluyendo todos los suplementos, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (cuarta edición) de MR Green y J. Sambrook y Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (2013, 2.^a edición).

A menos que se defina de otra manera, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. En el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en el presente documento toman precedente sobre cualquier diccionario o definición extrínseca. A menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos en singular deben incluir el plural y los términos en plural deben incluir el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso del término "incluyendo", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en relación con el cultivo de células y tejidos, la biología molecular, la inmunología, la microbiología, la genética y la química e hibridación de proteínas y ácidos

nucleicos descrita en el presente documento es bien conocida y se usa habitualmente en la técnica. Los métodos y técnicas que se proporcionan en el presente documento se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y se analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se lleva a cabo habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en el presente documento son las ya conocidas y usadas habitualmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

Para que la divulgación se pueda entender más fácilmente, a continuación se definen algunos términos seleccionados.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos y abarca proteínas nativas o artificiales, análogos polipeptídicos o variantes de una secuencia de proteína, o fragmentos de los mismos, a menos que lo contradiga el contexto. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico. Un fragmento de polipéptido comprende al menos aproximadamente 5 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos o al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, por ejemplo.

La expresión "proteína aislada" o "polipéptido aislado" se refiere a una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de procedencia no está asociado con componentes asociados naturalmente que lo acompañan en su estado natural; carece sustancialmente de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no se produce en la naturaleza. Por lo tanto, una proteína o polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente será "aislado" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína o polipéptido también puede volverse sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados mediante aislamiento usando técnicas de purificación de proteínas ya conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de unión" o "polipéptido de unión" se referirá a una proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o inmunoadhesina) que contiene al menos un sitio de unión que es responsable de la unión selectiva a un antígeno diana de interés (por ejemplo, un antígeno diana humano). Los sitios de unión incluyen un dominio variable de anticuerpo, un sitio de unión a ligando de un receptor, o un sitio de unión a receptor de un ligando. En determinados aspectos, las proteínas de unión o los polipéptidos de unión comprenden múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) sitios de unión. En determinados aspectos, la proteína de unión o el polipéptido de unión es una enzima terapéutica.

El término "ligando" se refiere a cualquier sustancia capaz de unirse o de ser unida por otra sustancia. De manera similar, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia para la cual se puede generar un anticuerpo. Aunque "antígeno" se usa comúnmente en referencia a un sustrato de unión a

anticuerpo y "ligando" se usa a menudo cuando se hace referencia a sustratos de unión a receptores, estos términos no se distinguen entre sí y abarcan una amplia gama de entidades químicas parcialmente coincidentes. Para evitar dudas, en todo el presente documento el antígeno y el ligando se usan indistintamente. Los antígenos/ligandos pueden ser un péptido, un polipéptido, una proteína, un aptámero, un polisacárido, una molécula de azúcar, un carbohidrato, un lípido, un oligonucleótido, un polinucleótido, una molécula sintética, una molécula inorgánica, una molécula orgánica y cualquier combinación de las mismas.

La constante de disociación (K_D) de una proteína de unión se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial. Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón superficial mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (un antígeno diana en una matriz de biosensor) y el analito (una proteína de unión en solución) mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmón superficial también se puede realizar inmovilizando el analito (proteína de unión en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (antígeno diana). Como se usa en el presente documento, el término " K_D " se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión particular y un antígeno diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a la capacidad de un anticuerpo o una inmunoadhesina para unirse a una diana (por ejemplo, un antígeno) con una constante de disociación (K_D) de como máximo aproximadamente 1×10^{-6} M, aproximadamente 1×10^{-7} M, aproximadamente 1×10^{-8} M, aproximadamente 1×10^{-9} M, aproximadamente 1×10^{-10} M, aproximadamente 1×10^{-11} M, aproximadamente 1×10^{-12} M o menos, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos aproximadamente dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico. La unión específica de un anticuerpo puede ser a un antígeno diana a través de las secuencias CDR. Un anticuerpo también puede unirse específicamente a FcR, tales como FcR α o Fc γ RIIIa a través de la región Fc.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a dichos conjuntos (por ejemplo, moléculas de anticuerpo intactas, inmunoadhesinas o variantes de las mismas) que tienen una actividad inmunorreactiva específica conocida significativa para un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras básicas de inmunoglobulina en los sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien.

Como se analizará con más detalle a continuación, el término genérico "anticuerpo" comprende cinco clases distintas de anticuerpo que se pueden distinguir bioquímicamente. Aunque las cinco clases de anticuerpos están claramente dentro del alcance de la presente divulgación, el siguiente análisis se referirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas ligeras idénticas con un peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons, y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 53,000-70,000. Las cuatro cadenas se unen

mediante enlaces disulfuro en una configuración en "Y", en donde las cadenas ligeras se asocian a las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continúan a través de la región variable.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulina se clasifican como kappa (κ) o lambda (λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras genomanipuladas. En la configuración en Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o épsilon (ϵ), con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, γ 1- γ 4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA o IgE, respectivamente. Las subclases de isotipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc.) están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la técnica a la vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente divulgación.

Las cadenas tanto ligera como pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. El término "región" se refiere a una parte o porción de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo e incluye región constante o regiones variables, así como partes o porciones más discretas de dichas regiones. Por ejemplo, las regiones variables de cadena ligera incluyen "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" intercaladas entre "regiones marco" o "FR", como se definen en el presente documento.

Las regiones de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina pueden definirse como región "constante" (C) o regiones "variables" (V), basándose en una falta relativa de variación de secuencia dentro de las regiones de diversos miembros de la clase en el caso de una "región constante", o basándose en una variación significativa dentro de las regiones de diversos miembros de la clase en el caso de "regiones variables". Las expresiones "región constante" y "región variable" también pueden usarse funcionalmente. A este respecto, se apreciará que las regiones variables de una inmunoglobulina o anticuerpo determinan el reconocimiento y la especificidad de antígeno. Por el contrario, las regiones constantes de una inmunoglobulina o anticuerpo confieren funciones efectoras importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Las regiones constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas se pliegan en dominios. El término "dominio" se refiere a una región globular de una cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (por ejemplo, que comprende de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante lámina plegada β y/o enlace disulfuro intracatenario. Los dominios de región constante en la cadena ligera de una inmunoglobulina se denominan indistintamente "dominios de región

constante de cadena ligera", "regiones CL" o "dominios CL". Los dominios constantes en la cadena pesada (por ejemplo, dominios bisagra, CH1, CH2 o CH3) se denominan indistintamente "dominios de región constante de cadena pesada", dominios de región "CH" o "dominios CH". Los dominios variables en la cadena ligera se denominan indistintamente "dominios de región variable de cadena ligera", "dominios de región VL" o "dominios VL". Los dominios variables en la cadena pesada se denominan indistintamente "dominios de región variable de cadena pesada", dominios de región "VH" o "dominios VH".

Por convención, la numeración de los aminoácidos de los dominios de región constante variable aumenta a medida que se alejan del sitio de unión a antígeno o el extremo amino de la inmunoglobulina o anticuerpo. El extremo N de cada cadena de inmunoglobulina pesada y ligera es una región variable y el extremo C es una región constante. Los dominios CH3 y CL comprenden el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Por consiguiente, los dominios de una inmunoglobulina de cadena ligera están dispuestos en una orientación VL-CL, mientras que los dominios de la cadena pesada están dispuestos en la orientación VH-CH1-bisagra-CH2-CH3.

La asignación de aminoácidos a cada dominio de región variable es según las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Kabat también proporciona una convención de numeración ampliamente usada (numeración de Kabat) en la que se asigna el mismo número a los residuos correspondientes entre diferentes regiones variables de cadena pesada o entre diferentes regiones variables de cadena ligera. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VL también se denominan en el presente documento, respectivamente, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. Las CDR 1, 2 y 3 de un dominio VH también se denominan en el presente documento, respectivamente, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. Si así se indica, la asignación de CDR puede ser según la IMGT® (Lefranc *et al.*, Developmental & Comparative Immunology 27:55-77; 2003) en lugar de ser según Kabat. La numeración de la región constante de cadena pesada se realiza a través del índice EU como se expone en Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR o FR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de una serie de esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273, 927-948 (esquema de numeración de "Chothia"), MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745. (Esquema de numeración de "Contact"), Lefranc M P *et al.*, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, enero de 2003; 27(1):55-77 (esquema de numeración de "IMGT") y Honegger A y Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70, (esquema de numeración de AHO).

Los límites de una CDR o FR dada pueden variar dependiendo del esquema usado para la identificación. Por ejemplo, el esquema de Kabat se basa en alineaciones estructurales, mientras que el esquema de Chothia se basa en información estructural. La numeración para los esquemas de Kabat y

Chothia se basa en las longitudes de las secuencias de regiones de anticuerpo más comunes, con inserciones incorporadas por letras de inserción, por ejemplo, "30a", y eliminaciones que aparecen en algunos anticuerpos. Los dos esquemas colocan determinadas inserciones y eliminaciones ("indeles") en diferentes posiciones, lo que da como resultado una numeración diferencial. El esquema de

5 Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia.

Como se usan en el presente documento, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración llamado "IMGT" descrito en Lefranc (1999), *The Immunologist*, vol. 7:132-136 y Lefranc *et al.* (1999), *Nucleic Acids Res.*, vol. 27:209-212.

10 Como se usan en el presente documento, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de los bucles estructurales de inmunoglobulina. Chothia y Lesk (1987), *J. Mol. Biol.*, vol.196:901-917; Al-Lazikani *et al.* (1997), *J. Mol. Biol.*, vol. 273:927-948; Chothia *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.*, vol. 227:799-817; Tramontano A *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* vol. 215(1):175-82.

15 Como se usan en el presente documento, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Honegger-Pluckthun descrito en Honnegger y Pluckthun (2001), *J. Mol. Biol.*, vol. 309(3):657-670.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio VH" incluye el dominio variable amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, y la expresión "dominio VL" incluye el dominio variable amino terminal de una cadena ligera de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH1" incluye el primer dominio de región constante (el más amino terminal) de una cadena pesada de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 114-223 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 118-215). El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y el amino terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina y no forma parte de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. La región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite que las dos regiones de unión a antígeno en el extremo N se muevan de forma independiente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior (Roux *et al.* *J. Immunol.* 1998, 161:4083).

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 244-360 en el sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 231-340). El dominio CH2 es único en el sentido de que no está emparejado estrechamente con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas por N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. En una realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CH2 procedente de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH3" incluye la porción de una molécula de inmunoglobulina de cadena pesada que se extiende aproximadamente 110 residuos desde el extremo N del dominio CH2, por ejemplo, desde aproximadamente las posiciones 361-476 del sistema de numeración de Kabat (posiciones EU 341-445). El dominio CH3 típicamente forma la porción en el extremo C del anticuerpo. Sin embargo, en algunas inmunoglobulinas, pueden extenderse dominios adicionales desde el dominio CH3 para formar la porción en el extremo C de la molécula (por ejemplo, el dominio CH4 en la cadena μ de IgM y la cadena ϵ de IgE). En una realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CH3 procedente de una molécula de IgG1 (por ejemplo, una molécula de IgG1 humana).

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CL" incluye el dominio de la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente la posición de Kabat 107A a aproximadamente la posición de Kabat 216. El dominio CL es adyacente al dominio VL. En una realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un dominio CL procedente de una cadena ligera kappa (por ejemplo, una cadena ligera kappa humana).

Las regiones variables de un anticuerpo le permiten reconocer selectivamente y unirse específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable (Fv) que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) en cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión a antígeno" incluye un sitio que se une específicamente a un antígeno (por ejemplo, una superficie celular o un antígeno soluble). El sitio de unión al antígeno incluye una región variable de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina y el sitio de unión formado por estas regiones variables determina la especificidad del anticuerpo. Un sitio de unión al antígeno está formado por regiones variables que varían de un anticuerpo a otro. Los anticuerpos alterados de la presente divulgación comprenden al menos un sitio de unión a antígeno.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos de unión de la presente divulgación comprenden al menos dos dominios de unión a antígeno que proporcionan la asociación del polipéptido de unión con el antígeno seleccionado. Los dominios de unión a antígeno no necesitan proceder de la misma molécula de inmunoglobulina. En este sentido, la región variable puede proceder de cualquier tipo de animal que pueda ser inducido a generar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de un polipéptido de unión puede ser, por ejemplo, de origen mamífero, por ejemplo, puede ser humana, murina, de rata, de cabra, de oveja, de primate no humano (tales como macacos cangrejeros, macacos, etc.), de lupino o de camélido (por ejemplo, camellos, llamas y especies relacionadas).

En los anticuerpos de origen natural, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que están posicionadas específicamente para formar el sitio de unión a antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables pesados y ligeros muestran una menor variabilidad

intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones marco. Las regiones de estructura adoptan en gran medida una conformación de lámina β y los CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Por lo tanto, estas regiones marco actúan para formar un armazón que permite posicionar las seis CDR en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes intercatenarias. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo al epítipo del antígeno inmunorreactivo.

Los polipéptidos de unión de ejemplo incluyen variantes de anticuerpos. Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas y genomanipuladas de anticuerpos que se alteran de manera que no aparecen de forma natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos con dominio eliminado o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos, etc.) alteradas para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítopos en un solo antígeno); moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Además, la expresión "variante de anticuerpo" incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se unen a tres, cuatro o más copias del mismo antígeno).

Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión diana potenciales en un polipéptido. Cada sitio de unión diana se une específicamente a una molécula diana o sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión diana, cada sitio de unión diana puede unirse específicamente a las mismas o diferentes moléculas (por ejemplo, puede unirse a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos en el mismo antígeno). Los polipéptidos de unión en cuestión tienen típicamente al menos un sitio de unión específico para una molécula de antígeno humano. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal IgG1 típico es específico para un antígeno diana. Un anticuerpo bivalente es uno que comprende dominios de unión a antígeno que se dirigen a dos antígenos diferentes, o dos dominios de unión a antígeno que se dirigen a un antígeno. De manera similar, un anticuerpo trivalente puede ser un anticuerpo monoespecífico con tres dominios de direccionamiento a un solo antígeno. Un anticuerpo trivalente puede ser biespecífico si se une a un primer antígeno con dos dominios de unión y a un segundo antígeno con otro dominio de unión. Un anticuerpo trivalente puede ser triespecífico y unirse a tres dianas diferentes.

El término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse específicamente (por ejemplo, inmunorreaccionar con) un antígeno diana determinado (por ejemplo, un antígeno diana humano). Un polipéptido de unión puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a la misma diana o a dianas diferentes. En determinadas realizaciones, un polipéptido de unión es específico para dos porciones diferentes (por ejemplo, no superpuestas) de la misma diana. En determinadas realizaciones, un polipéptido de unión es específico para más de una diana. Los polipéptidos de unión de ejemplo (por ejemplo, anticuerpos) que comprenden sitios de unión de

antígeno que se unen a antígenos expresados en células tumorales se conocen en la técnica y una o más CDR de dichos anticuerpos se pueden incluir en un anticuerpo como se describe en el presente documento.

Como se usan en el presente documento, el término "antígeno" o la expresión "antígeno diana" se refieren a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse al sitio de unión de un polipéptido de unión. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de aproximadamente un 20 %, tal como dentro de aproximadamente un 10 %, dentro de aproximadamente un 5 % o dentro de aproximadamente un 1 % o menos de un valor o intervalo determinado.

Como se usa en el presente documento, "administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o administrar físicamente de otro modo una sustancia tal como existe fuera del cuerpo (por ejemplo, un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento) en un paciente, tal como, pero sin limitación, mediante suministro pulmonar (por ejemplo, inhalación), mucoso (por ejemplo, intranasal), intradérmico, intravenoso, intramuscular, subcutáneo y/o cualquier otro método de suministro físico descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando una enfermedad, o un síntoma de la misma, se está tratando o controlando, la administración de la sustancia normalmente se realiza después del inicio de la enfermedad o de los síntomas de la misma. Cuando se pretende prevenir una enfermedad o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia se produce típicamente antes de la aparición de la enfermedad o síntomas de la misma y puede continuarse de forma crónica para retrasar o reducir la aparición o la magnitud de los síntomas asociados a la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que contiene los ingredientes especificados (por ejemplo, un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento) en, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que sea resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes especificados en, opcionalmente, las cantidades especificadas.

"Cantidad eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo (por ejemplo, un polipéptido de unión aislado de la presente divulgación) suficiente para lograr un resultado fisiológico deseado en un individuo que necesita el agente. La cantidad eficaz puede variar entre individuos dependiendo de la salud y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la condición médica del individuo y otros factores relevantes.

Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente. Como se usa en el presente documento, un sujeto puede ser un mamífero, tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (por ejemplo, mono y ser humano). En determinadas realizaciones, el término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un vertebrado, tal como un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin limitación, seres humanos, primates no humanos, animales salvajes, animales asilvestrados, animales de granja, animales deportivos y mascotas.

Como se usa en el presente documento, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede usar en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad

o un síntoma relacionado con la misma. En algunas realizaciones, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se pueda usar en la modulación de una respuesta inmunitaria a una infección en un sujeto o un síntoma relacionado con la misma. En algunas realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la prevención, control, tratamiento y/o mejora de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma, conocidas por un experto en la técnica, tal como el personal médico. En otras realizaciones, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en la modulación de una respuesta inmunitaria a una infección en un sujeto o un síntoma relacionado con la misma, conocidas por un experto en la técnica, tal como el personal médico.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "que trata/n" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma, resultante de la administración de una o más terapias (incluyendo, pero sin limitación, la administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un polipéptido de unión aislado proporcionado en el presente documento). Como se usa en el presente documento, el término "tratar" también puede referirse a alterar el curso de la enfermedad del sujeto que se está tratando. Los efectos terapéuticos del tratamiento incluyen, sin limitación, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, la mejora o paliación de la patología y la remisión o mejora del pronóstico.

BCMA

Como se usa en el presente documento, el término "BCMA" se refiere al antígeno de maduración de linfocitos B. El BCMA (también conocido como TNFRSF17, BCM o CD269) es un miembro de la familia del receptor de necrosis tumoral (TNFR) y se expresa predominantemente en linfocitos B diferenciados terminalmente, por ejemplo, linfocitos B de memoria y células plasmáticas. Sus ligandos se denominan activador de linfocitos B de la familia TNF (BAFF, por sus siglas en inglés) y ligando inductor de proliferación (APRIL, por sus siglas en inglés). El BCMA participa en la mediación de la supervivencia de las células plasmáticas para mantener la inmunidad humoral a largo plazo. El gen del BCMA está codificado en el cromosoma 16 y produce una transcripción de ARNm primario 35 de 994 nucleótidos de longitud (acceso de NCBI NM_001192.2) que codifica una proteína de 184 aminoácidos (NP_001183.2). Se ha descrito una segunda transcripción no codificante procedente del locus BCMA, que puede desempeñar un papel en la regulación de la expresión del BCMA. (Laabi Y. *et al.*, Nucleic Acids Res., 1994, 22:1147-1154). Se han descrito variantes de transcripción adicionales con significado desconocido (Smirnova A S *et al.* Mol Immunol., 2008, 45(4):1179-1183. Se ha identificado una segunda isoforma, también conocida como TV4, (identificador Uniprot Q02223-2). "BCMA" incluye proteínas que comprenden mutaciones, por ejemplo, mutaciones puntuales, fragmentos, inserciones, eliminaciones y variantes de corte y empalme de BCMA de tipo natural de longitud completa.

Linfocitos citolíticos naturales

Como se usa en el presente documento, "linfocitos citolíticos naturales" o "linfocitos NK" se refiere a una subpoblación de linfocitos que participa en la inmunidad innata. Los linfocitos NK se pueden identificar en virtud de determinadas características y propiedades biológicas, tales como la expresión de antígenos de superficie específicos, incluyendo CD16, CD56 y/o CD57, NKp46 para los linfocitos NK humanos, la ausencia del complejo TCR alfa/beta o gamma/delta en la superficie celular, la capacidad de unirse y destruir células que no expresan antígenos MHC/HLA "propios" mediante la activación de maquinaria citolítica específica, la capacidad de destruir células tumorales u otras células enfermas que expresan un ligando para receptores activadores de NK, y la capacidad de liberar moléculas proteicas denominadas citocinas que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria. Cualquiera de estas características y actividades se puede usar para identificar linfocitos NK, usando métodos bien conocidos en la técnica. Cualquier subpoblación de linfocitos NK también estará comprendida en el término linfocitos NK. En el contexto del presente documento, los linfocitos NK "activos" designan linfocitos NK biológicamente activos, incluyendo los linfocitos NK que tienen la capacidad de lisar células diana o de mejorar la función inmunitaria de otras células. Los linfocitos NK se pueden obtener mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, tales como el aislamiento de muestras de sangre, la citaféresis, las colecciones de tejidos o células, etc. Se pueden encontrar protocolos útiles para ensayos que implican linfocitos NK en Natural Killer Cells Protocols (editado por Campbell KS y Colonna M). Human Press. págs. 219-238 (2000).

NKp46

Como se usa en el presente documento, el marcador "NKp46" o "receptor 1 desencadenante de citotoxicidad natural", también conocido como "CD335" o "NKP46" o "NK-p46" o "LY94" se refiere a una proteína o polipéptido codificado por el gen *Ncr1*. Una secuencia de referencia de la proteína NKp46 humana de longitud completa está disponible en la base de datos del NCBI con el número de acceso NP_004820. La secuencia de ARNm de NKp46 humana se describe en el número de acceso del NCBI NM_004829.

Activador de linfocitos NK

Como se usa en el presente documento, el polipéptido competente para efector aislado comprende un anticuerpo multiespecífico en un formato de activador de linfocitos NK. Un "activador de linfocitos NK" se refiere a proteínas de unión que comprenden dominios de anticuerpos monoclonales que se dirigen a receptores activadores de linfocitos NK, regiones de direccionamiento específicas de antígeno y, opcionalmente, una región Fc (Gauthier, *et al.* (2019) Cell, 177: 1701-13). Los linfocitos NK expresan CD16a, también conocido como FcγRIIIa, que se une con baja afinidad a las partes Fc de los anticuerpos (Cerwenka y Lanier (2018) Science 359:6383). La activación de CD16a es menos exigente en comparación con la activación de CD3 debido a menores impedimentos estéricos y, además, se ve facilitada por la falta de moléculas accesorias. Al reconocer una célula diana decorada con anticuerpos, los linfocitos NK median en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), lo que da como resultado la destrucción de las células diana (Lo Nigro (2019) Ann Transl Med 7:105). Este mecanismo de origen natural se puede utilizar para activar CD16 cuando se combina con NKp46 (otro receptor activador de linfocitos NK) para

generar un activador de linfocitos citolíticos naturales (es decir, NKCE) trifuncional que produce resultados terapéuticos impresionantes. Para una revisión de los activadores de linfocitos NK, véase Demaria *et al.* (2021) Eur. J. Immunology 51(8): 1934, incorporado en su totalidad por referencia en el presente documento.

- 5 Los NKCE trifuncionales son más potentes *in vitro* que los anticuerpos terapéuticos clínicos dirigidos al mismo antígeno y también tienen una farmacocinética *in vivo* similar a los anticuerpos IgG completos y no tienen efectos inespecíficos. Véase la Solicitud Internacional N.º PCT/IB21/62494, incorporada en su totalidad por referencia en el presente documento.

Dominios Fc

- 10 En determinados aspectos de la divulgación, se proporcionan dominios Fc, por ejemplo, variantes del dominio Fc. Como se usa en el presente documento, la expresión "región Fc" o "dominio Fc" se refiere a la porción de una región constante de cadena pesada que comienza en la región bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión de papaína (es decir, el residuo 216 en IgG, tomando el primer residuo de la región constante de cadena pesada como 114) y termina en el extremo C del anticuerpo. Por consiguiente,
- 15 una región Fc completa comprende al menos un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

- La región Fc de un anticuerpo participa en la unión no antigénica y puede mediar en la función efectora uniéndose a un receptor Fc. Existen varios tipos diferentes de receptores Fc, que se clasifican en función del tipo de anticuerpo que reconocen. Por ejemplo, los receptores Fc-gamma (FcγR) se unen a los anticuerpos de clase IgG, los receptores Fc-alfa (FcαR) se unen a los anticuerpos de clase IgA, y los
- 20 receptores Fc-épsilon (FcεR) se unen a los anticuerpos de clase IgE. El receptor Fc neonatal (FcRn) interactúa con la región Fc de un anticuerpo para promover el reciclaje de anticuerpos a través del rescate de la degradación lisosomal normal. Los FcγR pertenecen a una familia que incluye varios miembros, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcγRIIIb.

Como se usa en el presente documento, la expresión "Fc nativo" o "Fc de tipo natural" se refiere a una molécula que corresponde a la secuencia de un fragmento que no se une a antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es típicamente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas, tales como IgG1 e IgG2. Las moléculas de Fc natural están formadas por polipéptidos monoméricos que pueden asociarse en formas dimericas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc natural varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgA2). Un ejemplo de Fc natural es un dímero con enlaces disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. Como se usa en el presente documento, la expresión "Fc natural" es genérica para las formas monoméricas, dimericas y multiméricas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "variante del dominio Fc", "variante de Fc" o "Fc modificado" se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc natural/de tipo natural pero que aún comprende un sitio de unión para un FcR. Por lo tanto, la expresión "variante de Fc"

puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc natural no humano. Además, un Fc natural comprende regiones que se pueden eliminar porque proporcionan características estructurales o actividades biológicas que no son necesarias para los polipéptidos de unión similares a anticuerpos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la expresión "variante de Fc" comprende una

5 molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc natural, o en la que se han modificado uno o más sitios o residuos de Fc, que afectan o participan en: (1) la formación de enlaces disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la heterogeneidad en el extremo N tras la expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glucosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor Fc distinto de un receptor de rescate, o (7) la citotoxicidad

10 celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Como se usa en el presente documento, una "variante de Fc competente para efector" o "polipéptido competente para efector" se refiere a un dominio Fc que tiene una o más funciones efectoras de Fc, como se describe más adelante en el presente documento.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante de Fc presentada en el presente

15 documento tiene una o más de una semivida sérica aumentada, afinidad de unión a FcRn mejorada, afinidad de unión a FcRn mejorada a pH ácido, afinidad de unión a FcγRIIIa mejorada, y/o estabilidad térmica similar, en comparación con un Fc de tipo natural.

FcγRIIIa V176, o FcγRIIIa V158, o receptor CD16a-V humano, o CD16aV, se refieren a una construcción polipeptídica que comprende un fragmento del receptor humano CD16 que se une a una

20 región Fc de un anticuerpo natural, que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y que porta una valina (V) en la posición 176 o la posición 158, que también se informa en la bibliografía como alotipo CD16a V176 o alotipo CD16a V158.

FcγRIIIa F176, o FcγRIIIa F158, o receptor CD16a-F humano, o CD16a^F, se refieren a una construcción polipeptídica que comprende un fragmento del receptor humano CD16 que se une a una región Fc de un anticuerpo natural, que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y que lleva una fenilalanina (F) en la posición 176 o la posición 158, que también se informa en la bibliografía como alotipo CD16a F176 o alotipo CD16a F158.

Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio Fc" abarca Fc natural/de tipo natural y variantes y secuencias de Fc como se define en el presente documento. Al igual que con las variantes de Fc y las moléculas de Fc natural, la expresión "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas a partir de un anticuerpo entero o producidas por otros medios.

En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc, como se describe en el presente documento, está estabilizado térmicamente.

En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc, como se describe en el presente documento, está glucosilado (por ejemplo, a través de glucosilación ligada a N). En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc comprende glucosilación ligada a N, por ejemplo, en un motivo de glucosilación ligada a N que contiene la secuencia de aminoácidos NXT o NXS (siendo X cualquier residuo

de aminoácido excepto prolina). En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc está glucosilado en la posición aminoacídica 297, de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc, como se describe en el presente documento, es competente para efector.

- 5 En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc, como se describe en el presente documento, es cualquier combinación de estabilizado térmicamente, glucosilado y competente para efector.

Variantes del dominio Fc estabilizado térmicamente

- 10 La estructura de los dominios constantes de anticuerpos es similar a la de los dominios variables que consisten en cadenas β conectadas con bucles y hélices cortas. El dominio CH2 de las regiones constantes pesadas exhibe interacciones proteína-proteína intercatenarias mediadas por carbohidratos débiles en contraste con las interacciones intercatenarias extensas exhibidas en otros dominios. Los dominios CH2 murinos aislados son relativamente inestables a temperatura fisiológica (Feige *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 344:107-118), pero los esfuerzos anteriores demuestran que la termoestabilidad de los dominios CH2 puede mejorarse con la adición de enlaces disulfuro intracatenarios, y que estos podrían usarse como armazones para aglutinantes (Gong *et al.*, 2009, *J. Biol. Chem.* 284:14203-210).

- 15 Se conocen variantes del dominio Fc de mejora de la función efectora y que presentan una mayor inestabilidad térmica (es decir, una menor estabilidad térmica) en relación con un dominio Fc de tipo natural. Por ejemplo, las variantes S239D/I332E y S239D/I332E/A330L provocan una menor estabilidad del dominio CH2, como lo indica la disminución de la temperatura de fusión (T_m) en el análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC). G236A/S239D/A330L/I332E tiene una medición de desplazamiento térmico de proteínas reducida en comparación con el tipo natural, así como una semivida considerablemente reducida en ratones transgénicos hFcγR. (Véanse Liu *et al.* (2014) *J. Biol. Chem.* 289(6): 3571, y Liu *et al.* (2020) *Antibodies* 9(4): 64 para una revisión).

Se conocen variantes del dominio Fc de mejora de la función efectora que tienen una unión mejorada a FcγR, en donde la estabilidad no se reduce significativamente en comparación con el tipo natural. (Véase, por ejemplo, Igawa *et al.*, documento EP 2 940 135)

Se ha descubierto además que las variantes del dominio Fc termoestabilizadas pueden producirse introduciendo uno o más enlaces disulfuro en el dominio Fc. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una variante del dominio Fc que comprende uno o más enlaces disulfuro genomanipulados (por ejemplo, no naturales), por ejemplo, enlaces disulfuro intracatenarios mediados, por ejemplo, por uno o más pares de cisteínas.

En determinadas realizaciones de ejemplo, un enlace disulfuro es un enlace disulfuro intracatenario entre las dos regiones CH2 de un dominio Fc. En determinadas realizaciones de ejemplo, un enlace disulfuro es un enlace disulfuro intracatenario entre las dos regiones CH3 de un dominio Fc. En determinadas realizaciones de ejemplo, dos o más enlaces disulfuro intracatenarios están presentes entre las dos regiones CH2 de un dominio Fc y/o entre las dos regiones CH3 de un dominio Fc.

La estabilidad térmica, o la propensión de un dominio Fc (por ejemplo, un dominio Fc con o sin un polipéptido de unión) a desplegarse, puede determinarse usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la temperatura de desdoblamiento o desnaturalización se puede medir mediante calorimetría diferencial de barrido en formato nanométrico (nanoDSC) o fluorimetría diferencial de barrido en formato nanométrico (nanoDSC) (Wen *et al.*, 2020 *Anal. Biochem.* 593:113581). La temperatura detectable a la que la proteína comienza a desplegarse es la *Tinicio*.

En determinadas realizaciones de ejemplo, la *Tinicio* de una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente (que tiene uno o más enlaces disulfuro genomanipulados) aumenta en relación con una variante del dominio Fc que no está estabilizada térmicamente. En determinadas realizaciones de ejemplo, la *Tinicio* de una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente se aumenta en aproximadamente 1.0 °C, aproximadamente 1.5 °C, aproximadamente 2.0 °C, aproximadamente 2.5 °C, aproximadamente 3.0 °C, aproximadamente 3.5 °C, aproximadamente 4.0 °C, aproximadamente 4.5 °C, aproximadamente 5.0 °C, aproximadamente 5.5 °C, aproximadamente 6.0 °C, aproximadamente 6.5 °C, aproximadamente 7.0 °C, aproximadamente 7.5 °C, aproximadamente 8.0 °C, aproximadamente 8.5 °C, aproximadamente 9.0 °C, aproximadamente 9.5 °C, aproximadamente 10.0 °C, aproximadamente 10.5 °C, aproximadamente 11.0 °C, aproximadamente 11.5 °C, aproximadamente 12.0 °C, aproximadamente 12.5 °C, aproximadamente 13.0 °C, aproximadamente 13.5 °C, aproximadamente 14.0 °C, aproximadamente 14.5 °C, aproximadamente 15.0 °C, aproximadamente 15.5 °C, aproximadamente 16.0 °C, aproximadamente 16.5 °C, aproximadamente 17.0 °C, aproximadamente 17.5 °C, aproximadamente 18.0 °C, aproximadamente 18.5 °C, aproximadamente 19.0 °C, aproximadamente 19.5 °C, aproximadamente 20.0 °C, aproximadamente 20.5 °C, aproximadamente 21.0 °C, aproximadamente 21.5 °C, aproximadamente 22.0 °C, aproximadamente 22.5 °C, aproximadamente 23.0 °C, aproximadamente 23.5 °C, aproximadamente 24.0 °C, aproximadamente 24.5 °C o aproximadamente 25.0 °C con respecto a una variante del dominio Fc que no está estabilizada térmicamente.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente tiene uno o más pares de sustitución de aminoácidos del grupo que consiste en sustituciones de cisteína en las: posiciones aminoacídicas 242 y 334; posiciones aminoacídicas 240 y 334; posiciones aminoacídicas 287 y 306; posiciones aminoacídicas 292 y 302; posiciones aminoacídicas 323 y 332; posiciones aminoacídicas 259 y 306; posiciones aminoacídicas 350 y 441; posiciones aminoacídicas 343 y 431; posiciones aminoacídicas 375 y 404; posiciones aminoacídicas 375 y 396; y posiciones aminoacídicas 348 y 439, de acuerdo con la numeración EU. (Véanse Wozniak-Knopp *et al.*, 2012, *PLoS One* 7: e30083; Jacobsen *et al.*, 2017 *J. Biol. Chem.* 202:1865-75; documento WO2014153063 para revisiones).

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado (por ejemplo, no natural) mediado por un par de cisteínas que sustituyen a (i) una leucina (L) en la posición aminoacídica 242 y una lisina (K) en la posición aminoacídica 334; (ii) una alanina (A) en la posición aminoacídica 287 y una leucina (L) en la posición aminoacídica 306; o (iii) una arginina (R) en la posición aminoacídica 292 y una valina (V) en la posición aminoacídica 302, de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc termoestabilizada comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado (por ejemplo, no natural) mediado por un par de cisteínas que sustituyen a (i) una leucina (L) en la posición aminoacídica 242 y una lisina (K) en la posición aminoacídica 334; (ii) una arginina (R) en la posición aminoacídica 292 y una valina (V) en la posición aminoacídica 302, de acuerdo con la numeración EU.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado (por ejemplo, no natural) mediado por un par de cisteínas que sustituyen a una leucina (L) en la posición aminoacídica 242 y una lisina (K) en la posición aminoacídica 334. En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado (por ejemplo, no natural) mediado por un par de cisteínas que sustituyen una alanina (A) en la posición aminoacídica 287 y una leucina (L) en la posición aminoacídica 306. En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente comprende un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado (por ejemplo, no natural) mediado por un par de cisteínas que sustituyen a una arginina (R) en la posición aminoacídica 292 y una valina (V) en la posición aminoacídica 302. En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente puede comprender al menos un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado. En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc estabilizada térmicamente puede comprender más de un enlace disulfuro intracatenario genomanipulado.

Variantes del dominio Fc de mejora de la función efectora

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una variante del dominio Fc que comprende sustituciones de aminoácidos de mejora de la función efectora.

En una realización, una variante del dominio Fc con unión a FcγRIIIa alterada que comprende una o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión de FcγRIIIa mejorada que tiene una o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcγRIIIa mejorada comprende dos o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcγRIIIa mejorada comprende tres o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcγRIIIa mejorada comprende cuatro o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento.

En una realización, una variante del dominio Fc con unión a FcRn alterada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcRn mejorada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcRn mejorada comprende un dominio Fc que tiene dos o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento. En una

realización, una variante del dominio Fc con afinidad de unión a FcRn mejorada comprende un dominio Fc que tiene tres o más sustituciones de aminoácidos como se divulga en el presente documento.

En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede exhibir una afinidad de unión a FcRn específica de especie. En una realización, una variante del dominio Fc puede exhibir una afinidad de unión a FcRn hum a. En una realización, una variante del dominio Fc puede exhibir una afinidad de unión a FcRn cyno. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede exhibir una afinidad de unión a FcRn entre especies. Se dice que tales variantes del dominio Fc presentan reactividad cruzada entre una o más especies diferentes. En una realización, una variante del dominio Fc puede exhibir una afinidad de unión a FcRn tanto humana como cyno.

El receptor Fc neonatal (FcRn) interactúa con la región Fc de los anticuerpos para promover el reciclaje a través del rescate de la degradación lisosomal normal. Este proceso es un proceso dependiente del pH que tiene lugar en los endosomas a pH ácido (por ejemplo, un pH inferior a 6.5) pero no en las condiciones de pH fisiológico del torrente sanguíneo (por ejemplo, un pH no ácido). En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada a un pH ácido en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada a un pH inferior a 7.0, por ejemplo, a aproximadamente pH 6.5, a aproximadamente pH 6.0, a aproximadamente pH 5.5, a aproximadamente pH 5.0, en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada a un pH inferior a 7.0, por ejemplo, a aproximadamente pH 6.5, a aproximadamente pH 6.0, a aproximadamente pH 5.5, a aproximadamente pH 5.0, en comparación con la afinidad de unión a FcRn de un dominio Fc de tipo natural a un pH no ácido elevado. Un pH no ácido elevado puede ser, por ejemplo, un pH superior a 7.0, aproximadamente pH 7.0, aproximadamente pH 7.4, aproximadamente pH 7.6, aproximadamente pH 7.8, aproximadamente pH 8.0, aproximadamente pH 8.5, aproximadamente pH 9.0.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable que una variante del dominio Fc presente aproximadamente la misma afinidad de unión a FcRn a un pH no ácido que un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, puede ser deseable que una variante del dominio Fc presente una menor afinidad de unión a FcRn a un pH no ácido que un polipéptido de unión que comprende un dominio Fc modificado que tiene la doble sustitución de aminoácidos M428L/N434S, de acuerdo con la numeración EU (véase USPN 8.088.376). Por consiguiente, puede ser deseable que una variante del dominio Fc presente una perturbación mínima de la unión a FcRn dependiente del pH.

En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc que tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada a un pH ácido tiene una tasa de disociación de FcRn reducida (es decir, más lenta) en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc que tiene una afinidad de unión a FcRn mejorada a un pH ácido en comparación con la afinidad de unión a FcRn del polipéptido de unión a un pH no ácido elevado, tiene una tasa de disociación de FcRn más lenta a un pH ácido en comparación con la tasa de disociación de FcRn de un dominio Fc de tipo natural a un pH no ácido elevado.

Determinadas realizaciones incluyen variantes del dominio Fc en las que al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de región constante se ha eliminado o alterado de otro modo para proporcionar características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas o mejoradas, la capacidad de dimerizarse de forma no covalente, mayor capacidad de localización en el sitio de un tumor, semivida sérica reducida o semivida sérica aumentada en comparación con un anticuerpo completo, inalterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad.

En determinadas realizaciones diferentes, una variante del dominio Fc comprende regiones constantes procedentes de diferentes isotipos de anticuerpos (por ejemplo, regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana). En otras realizaciones, una variante del dominio Fc comprende una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra procedentes de dominios de bisagra de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio de bisagra superior de una molécula IgG4 y un dominio de bisagra medio de IgG1). En determinadas realizaciones, el dominio Fc puede mutarse para aumentar o disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión alterada a un receptor Fc. Existen varios tipos diferentes de receptores Fc, que se clasifican en función del tipo de anticuerpo que reconocen. Por ejemplo, los receptores Fc-gamma (FcγR) se unen a los anticuerpos de clase IgG, los receptores Fc-alfa (FcαR) se unen a los anticuerpos de clase IgA, y los receptores Fc-épsilon (FcεR) se unen a los anticuerpos de clase IgE. Los FcγR pertenecen a una familia que incluye varios miembros, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcγRIIIb. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcγRIIIa alterada, en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcγRIIIa reducida, en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc tiene una afinidad de unión a FcγRIIIa mejorada, en comparación con un dominio Fc de tipo natural. En algunas realizaciones, un dominio Fc modificado con una variante del dominio Fc tiene aproximadamente la misma afinidad de unión a FcγRIIIa, en comparación con un dominio Fc de tipo natural.

En determinadas realizaciones, una variante del dominio Fc comprende una región constante de anticuerpo (por ejemplo, una región constante de IgG, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana) que media en una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del complejo C1 a una región constante de anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del sistema del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del sistema del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través del dominio Fc (los sitios de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo se unen a receptores Fc (FcR) en una célula). Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de anticuerpos a receptores Fc en las superficies celulares desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas, incluyendo la absorción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos

inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc, por ejemplo, un polipéptido de unión (por ejemplo, un anticuerpo, inmunoadhesina o una variante de anticuerpo) se une a un receptor Fc-gamma. En realizaciones alternativas, una variante del dominio Fc comprendía una región constante que carece de una o más funciones efectoras (por ejemplo, actividad ADCC) y/o no puede unirse al receptor Fcγ.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc de mejora de la función efectora tiene una o más sustituyentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 221; una cisteína (C) en la posición aminoacídica 222; una tirosina (Y) en la posición aminoacídica 234; una alanina (A) en la posición aminoacídica 236; un triptófano (W) en la posición aminoacídica 236; un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 239; una leucina (L) en la posición aminoacídica 243; un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 267; una fenilalanina (F) en la posición aminoacídica 268; una prolina (P) en la posición aminoacídica 292; una alanina (A) en la posición aminoacídica 298; una leucina (L) en la posición aminoacídica 300; una isoleucina (I) en la posición aminoacídica 305; una treonina (T) en la posición aminoacídica 324; un triptófano (W) en la posición aminoacídica 326; una alanina (A) en la posición aminoacídica 326; una leucina (L) en la posición aminoacídica 330; un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332; una alanina (A) en la posición aminoacídica 333; una serina (S) en la posición aminoacídica 333; una alanina (A) en la posición aminoacídica 334; una alanina (A) en la posición aminoacídica 336; una arginina (R) en la posición aminoacídica 345; y una leucina (L) en la posición aminoacídica 396, de acuerdo con la numeración EU. (Véase Saunders, 2009, *Front. Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2019.01296, para una revisión).

En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender una sustitución de aminoácidos en las posiciones seleccionadas de las posiciones aminoacídicas 236, 239, 330 y 332, de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, las sustituciones pueden comprender una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en el aminoácido 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332, de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender una doble sustitución de aminoácidos en dos cualesquiera posiciones aminoacídicas seleccionadas de una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, ácido aspártico (D) en el aminoácido 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender una triple sustitución de aminoácidos en tres cualesquiera posiciones aminoacídicas seleccionadas de una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en el aminoácido 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender una cuádruple sustitución de aminoácidos en cuatro cualesquiera posiciones aminoacídicas seleccionadas de una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en el aminoácido 239, una leucina (L) en la posición aminoacídica 330, y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica

332. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender la combinación de sustituciones de aminoácidos que comprenden un ácido aspártico (D) en el aminoácido 239 y un ácido glutámico (E) en la posición aminoacídica 332. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender la combinación de sustituciones de aminoácidos que comprenden una alanina (A) en la posición aminoacídica 236, un ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica y un ácido glutámico en la posición 332.

En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender además una sustitución de aminoácidos en las posiciones aminoacídicas 256 y/o 307, de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, una variante del dominio Fc puede comprender la combinación de sustituciones de aminoácidos que comprenden un ácido aspártico (D) en las posiciones aminoacídicas 256 y una glutamina (Q) en la posición aminoacídica 307 (véase Mackness *et al.*, 2019 *MAbs* 11:1276-88; documento WO2019147973A1, incorporado en su totalidad por referencia en el presente documento).

Variantes del dominio Fc glucosiladas

En determinadas realizaciones de ejemplo, una proteína de unión está glucosilada. Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un efecto profundo en la función de los anticuerpos, particularmente en el funcionamiento de los efectores, tales como los descritos anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd *et al.* (Mol. Immunol, 32: 1311-1318, 1996). Se contempla la glucosilación de una proteína de unión de la presente divulgación en donde se añade, se sustituye, se elimina o se modifica uno o más restos de carbohidratos. En algunas realizaciones, la glucosilación del dominio Fc de la proteína de unión es una glucosilación ligada a N. La introducción de un motivo asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un sitio potencial para la unión enzimática de restos de carbohidratos y, por lo tanto, se puede usar para manipular la glucosilación de una variante del dominio Fc. En Raju *et al.* (Biochemistry 40: 8868-8876, 2001), la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se aumentó a través de un proceso de regalactosilación y/o resialilación usando β -1,4-galactosiltransferasa y/o alfa, 2,3 sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialilación terminal aumenta la semivida de la inmunoglobulina.

Los anticuerpos, al igual que la mayoría de las glucoproteínas, se producen típicamente como una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente en células de mamífero. Se han desarrollado diversos métodos para fabricar glucoformas definidas (véase Zhang *et al.* 2004, Science 303: 371; Sears *et al.*, 2001, Science 291: 2344; Wacker *et al.*, 2002, Science 298: 1790; Davis *et al.* 2002, Chem. Rev. 102: 579; Hang *et al.*, 2001, Acc. Chem. Res. 34: 727). En algunas realizaciones, el dominio Fc glucosilado comprende un glucano natural en la posición aminoacídica 297, de acuerdo con la numeración EU. Se sabe que la glucosilación de la asparagina en la posición aminoacídica 297 en el dominio CH2 de IgG1 facilita la interacción entre el dominio Fc y Fc γ R. La eliminación de este sitio de glucosilación elimina la función efectora (Leabman, *et al.*, 2013, *MAbs* 5:896-903). En realizaciones particularmente de ejemplo, un dominio Fc comprende niveles de tipo natural, o niveles cercanos a los de tipo natural, de glucosilación en la posición aminoacídica 297, de acuerdo con la numeración EU.

En algunas realizaciones, la variante del dominio Fc glucosilada comprende un glucano modificado o no natural. En algunas realizaciones, el glucano modificado o no natural es un glucano modificado que se puede conjugar con una molécula terapéutica (por ejemplo, conjugado anticuerpo-fármaco).

Polipéptidos de unión que contienen Fc

5 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un variante del dominio Fc aislada que comprende o forma un complejo con (por ejemplo, se fusiona con) al menos un dominio de unión (por ejemplo, al menos un polipéptido de unión). En determinadas realizaciones, el dominio de unión comprende uno o más dominios de unión a antígeno. Los dominios de unión a antígeno no necesitan obtenerse de la misma molécula que el dominio Fc precursor. En determinadas realizaciones, la variante del dominio Fc
10 está presente en un anticuerpo.

En una realización, una variante del dominio Fc está presente en un anticuerpo o forma un complejo con un anticuerpo. Cualquier anticuerpo de cualquier fuente o especie se puede emplear con una variante del dominio Fc divulgada en el presente documento. Los anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Los anticuerpos adecuados
15 incluyen, sin limitación, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos de dominio único, tales como anticuerpos VHH.

En determinadas realizaciones de ejemplo, una variante del dominio Fc puede estar unida a o formar un complejo con un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une
20 al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se obtuvieron) por la unión a antígeno (es decir, la unión específica). Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante métodos recombinantes o bioquímicos que se conocen bien en la técnica. Los fragmentos de unión a antígeno de ejemplo incluyen Fv, Fab, Fab' y (Fab')₂. En determinadas realizaciones de ejemplo, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende al menos un fragmento de unión a antígeno y una variante del dominio Fc.

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión comprende una secuencia de región variable monocaténaria (ScFv). Las secuencias de región variable monocaténaria comprenden un solo polipéptido que tiene uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio VL unido por un enlazador flexible a un dominio VH. Las moléculas de ScFv se pueden construir en una orientación VH-enlazador-VL o VL-enlazador-VH. La bisagra flexible que une los dominios VL y VH que constituyen el sitio de unión a antígeno incluye de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. Los péptidos conectores son conocidos en la técnica. Los polipéptidos de unión pueden comprender al menos un scFv y/o al menos una región constante. En una realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación puede comprender al menos un scFv unido o fusionado a una variante del dominio Fc.

En algunas realizaciones, un polipéptido de unión de la presente divulgación es un anticuerpo multivalente (por ejemplo, tetravalente) que se produce fusionando una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo con una molécula de ScFv (por ejemplo, una molécula de ScFv alterada). Por ejemplo, en una realización, estas secuencias se combinan de manera que la molécula de ScFv (por ejemplo, una molécula

de ScFv alterada) se une en su extremo N o C a una variante del dominio Fc a través de un enlazador flexible (por ejemplo, un enlazador gly/ser). En otra realización, un anticuerpo tetravalente de la presente divulgación se puede elaborar fusionando una molécula de ScFv a un péptido conector, que se fusiona a una variante del dominio Fc para construir una molécula tetravalente de ScFv-Fab.

5 En otra realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación es un minicuerpo alterado. Un minicuerpo alterado de la presente divulgación es una molécula dimérica formada por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales comprende una molécula de ScFv que se fusiona a una variante del dominio Fc a través de un péptido conector. Los minicuerpos se pueden elaborar construyendo un componente ScFv y componentes peptídicos conectores usando los métodos descritos en la técnica
10 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 5.837.821 o el documento WO 94/09817A1). En otra realización, se puede construir un minicuerpo tetravalente. Los minicuerpos tetravalentes se pueden construir de la misma manera que los minicuerpos, excepto que dos moléculas ScFv se unen usando un enlazador flexible. A continuación, la construcción scFv-scFv unida se une a una variante del dominio Fc.

En otra realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un diacuerpo.
15 Los diacuerpos son moléculas diméricas tetravalentes que tienen cada una un polipéptido similar a las moléculas de scFv, pero que por lo general tienen un enlazador de residuos de aminoácidos corto (menos de 10, por ejemplo, aproximadamente de 1 a aproximadamente 5) que conecta ambos dominios variables, de modo que los dominios VL y VH en la misma cadena polipeptídica no pueden interactuar. En cambio, el dominio VL y VH de una cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH y VL (respectivamente) en una
20 segunda cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/02781). Los diacuerpos de la presente divulgación comprenden una molécula similar a scFv fusionada a una variante del dominio Fc.

En otra realización, un polipéptido de unión de la presente divulgación comprende un anticuerpo de dominio único (sdAb), también denominado VHH o nanocuerpo. Nanobody® es una marca registrada de Ablynx. Los VHH comprenden dominios de cadena pesada variables desprovistos de cadenas ligeras. De manera similar a los dominios VH convencionales, los VHH contienen cuatro FR y tres CDR. Los VHH tienen ventajas sobre los anticuerpos convencionales. Como son aproximadamente diez veces más pequeños que las moléculas de IgG, se pueden producir VHH funcionales correctamente plegados mediante expresión *in vitro* y, al mismo tiempo, lograr un alto rendimiento. Además, los VHH son muy estables y resistentes a la acción de las proteasas. Las propiedades y la producción de los VHH se ha revisado por Harmsen y De Haard H J (Appl. Microbiol. Biotechnol. Noviembre de 2007; 77(1):13-22).

En determinadas realizaciones de ejemplo, un dominio Fc se fusiona con uno o más VHH.

En otras realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden uno o más dominios variables en serie en la misma cadena polipeptídica, por ejemplo, polipéptidos de dominio variable en tándem (TVD, por sus siglas en inglés). Los polipéptidos TVD de ejemplo incluyen la configuración de "doble cabeza" o "doble Fv" descrita en la Patente de EE. UU. N.º 5,989,830. En la configuración doble Fv, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena polipeptídica tiene dos dominios VH en serie opcionalmente separados por

un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios opcionalmente conectados en serie por un enlazador peptídico (VL1-enlazador-VL2). En la configuración de doble cabeza entrecruzada, los dominios variables de dos anticuerpos diferentes se expresan en una orientación en tándem en dos cadenas polipeptídicas separadas (una cadena pesada y una cadena ligera), en donde una cadena polipeptídica tiene dos dominios VH en serie opcionalmente separados por un enlazador peptídico (VH1-enlazador-VH2) y la otra cadena polipeptídica consiste en dominios VL complementarios opcionalmente conectados en serie por un enlazador peptídico en la orientación opuesta (VL2-enlazador-VL1). Las variantes de anticuerpos adicionales basadas en el formato "doble Fv" incluyen el anticuerpo biespecífico IgG de dominio variable doble (DVD-IgG) (véase la patente de EE.UU. N.º 7,612,181 y el formato TBTI (véase el documento US 2010/0226923 A1). En algunas realizaciones, los polipéptidos de unión comprenden anticuerpos multiespecíficos o multivalentes que comprenden uno o más dominios variables en serie en la misma cadena polipeptídica fusionada a una variante del dominio Fc.

En otra realización, un polipéptido de unión comprende un anticuerpo biespecífico IgG de dominio variable doble (CODV-IgG) entrecruzado basado en una configuración de "doble cabeza" (véase el documento US20120251541 A1, que se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad).

En otras realizaciones, un polipéptido de unión comprende un formato multiespecífico CrossMab o CrossMab-Fab (véase el documento WO2009080253 y Schaefer, *et al.*, PNAS (2011), 108: 11187-1191). Las variantes de anticuerpos basadas en el formato CrossMab tienen un entrecruzamiento de dominios de anticuerpos dentro de un brazo de un anticuerpo IgG biespecífico que permite la asociación catenaria correcta.

En otras realizaciones, el polipéptido competente para efector glucosilado comprende un anticuerpo multiespecífico en un formato de activador de linfocitos T. Un "activador de linfocitos T" se refiere a proteínas de unión dirigidas al sistema inmunitario de un hospedador, más específicamente a la actividad citotóxica de los linfocitos T, así como dirigidas a una proteína diana tumoral. En algunas realizaciones, el polipéptido competente para efector aislado comprende un anticuerpo multiespecífico en un formato de activador de linfocitos NK. Un "activador de linfocitos NK" se refiere a proteínas de unión que comprenden fragmentos de anticuerpos monoclonales que se dirigen a receptores activadores de linfocitos NK, regiones de direccionamiento específicas de antígeno y una región Fc (Gauthier, *et al.* Cell (2019), 177: 1701-13).

Un polipéptido de unión de la presente divulgación, que comprende una variante del dominio Fc descrita en el presente documento, puede incluir las secuencias CDR o las secuencias de dominio variable de un anticuerpo "precursor" conocido. En algunas realizaciones, el anticuerpo precursor y el anticuerpo de la divulgación pueden compartir secuencias similares o idénticas, excepto por las modificaciones del dominio Fc como se divulga en el presente documento.

Variable doble entrecruzada

En una realización particular, "variable doble entrecruzada" o "CODV" se refiere a un dominio de unión a antígeno que se une específicamente al menos a un antígeno diana o al menos a un epítipo diana,

y comprende al menos dos cadenas polipeptídicas que forman al menos dos sitios de unión a antígeno, en donde al menos una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VL1-L1-VL2-L2-CL [I]

y al menos una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

5 VH2-L3-VH1-L4-CH1 [II]

en donde:

VL1 es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VL2 es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VH1 es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

10 VH2 es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina; y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

15 en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado.

En determinadas realizaciones de ejemplo, la proteína de unión de la divulgación comprende un formato "CODV-OL1", que comprende tres cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

20 VL1-L1-VL2-L2-CL [I];

una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VH2-L3-VH1-L4-CH1-bisagra-CH2-CH3 [III]; y

una cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

bisagra-CH2-CH3 [IV]

en donde:

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina;

CH2 es un dominio constante de cadena pesada CH2 de inmunoglobulina;

CH3 es un dominio constante de cadena pesada CH3 de inmunoglobulina;

bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios CH1 y CH2;

y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado.

En una realización particular, un dominio de unión a antígeno CODV se une específicamente al menos a un antígeno diana o al menos a un epítipo diana, y comprende cuatro cadenas polipeptídicas que

forman cuatro sitios de unión a antígeno, en donde cada una de dos cadenas polipeptídicas comprende una estructura representada por la fórmula:

VL1-L1-VL2-L2-CL [I]

y cada una de dos cadenas polipeptídicas comprende una estructura representada por la fórmula:

VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc [II]

en donde:

VL1 es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VL2 es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VH1 es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

VH2 es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina;

Fc es una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3; y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado,

en donde el par VH1/VL1 comprende una primera especificidad de unión a antígeno y el par VH2/VL2 comprende una segunda especificidad de unión a antígeno.

En una realización particular, una proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento es una proteína triespecífica y/o una proteína de unión a antígeno trivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a una o más dianas de antígeno diferentes, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VL2-L1-VL1-L2-CL [I]

la segunda cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VH1-L3-VH2-L4-CH1-bisagra-CH2-CH3 [II]

la tercera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VH3-CH1-bisagra-CH2-CH3 [III]

y la cuarta cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:

VL3-CL [IV],

en donde:

VL1 es un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VL2 es un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VL3 es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

VH1 es un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

VH2 es un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

VH3 es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

CL es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

CH1 es un dominio constante de cadena pesada CH1 de inmunoglobulina;

CH2 es un dominio constante de cadena pesada CH2 de inmunoglobulina;

5 CH3 es un dominio constante de cadena pesada CH3 de inmunoglobulina;

bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios CH1 y CH2; y

L1, L2, L3 y L4 son enlazadores de aminoácidos, en donde uno cualquiera o más de L1, L2, L3 y L4 están opcionalmente ausentes, y

10 en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par cadena pesada-cadena ligera entrecruzado.

En determinadas realizaciones, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica tienen una orientación entrecruzada que forma dos sitios de unión a antígeno distintos. En algunas realizaciones, VH1 y VL1 forman un par de unión y forman el primer sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, VH2 y VL2 forman un par de unión y forman el segundo sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el tercer polipéptido y el cuarto polipéptido forman un tercer sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, VH3 y VL3 forman un par de unión y forman el tercer sitio de unión a antígeno.

20 Dicha proteína de unión a antígeno comprende al menos tres sitios de unión a antígeno. Es al menos una molécula de unión a antígeno trivalente. En una realización particular, se une específicamente a una diana de antígeno, es decir, es una molécula de unión a antígeno monoespecífica. En otra realización, se une específicamente a dos dianas de antígeno diferentes, es decir, es una molécula de unión a antígeno biespecífica. En otra realización, se une específicamente a tres dianas de antígeno diferentes, es decir, es una molécula de unión a antígeno triespecífica.

Los ejemplos enumerados anteriormente no pretenden limitar el alcance de la divulgación de ninguna manera, y se ha demostrado que los enlazadores que comprenden aminoácidos seleccionados aleatoriamente seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina y prolina son adecuados en las proteínas de unión similares a anticuerpos descritas en el presente documento.

En determinadas realizaciones de la proteína de unión, (a) L1, L2, L3 y L4 tienen cada uno independientemente cero aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, S, RT, TKGPS, GQPKAAP y GGS GSSGSGG; o (b) L1, L2, L3 y L4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, S, RT, TKGPS, GQPKAAP y GGS GSSGSGG.

En determinadas realizaciones, L1 y L2 comprenden cada uno la secuencia de aminoácidos GGGGSGGGGS.

En determinadas realizaciones, en donde L3 y L4 están cada uno ausentes.

El formato de anticuerpo CODV, las diversas permutaciones del formato de anticuerpo CODV y detalles adicionales con respecto a los enlazadores se describen con más detalle en los documentos WO

2012/135345A1 y WO 2017/180913A2, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Ácidos nucleicos y vectores

5 En un aspecto, se proporcionan polinucleótidos que codifican las proteínas de unión divulgadas en el presente documento. También se proporcionan métodos para elaborar una proteína de unión que comprenden expresar estos polinucleótidos.

10 Los polinucleótidos que codifican las proteínas de unión divulgadas en el presente documento se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en células hospedadoras que se pueden usar para producir la cantidad deseada de las proteínas de unión reivindicadas. Por consiguiente, en determinados aspectos, la divulgación proporciona vectores de expresión que comprenden polinucleótidos divulgados en el presente documento y células hospedadoras que comprenden estos vectores y polinucleótidos.

15 El término "vector" o la expresión "vector de expresión" se usan en el presente documento para los fines de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a vectores usados para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Como saben los expertos en la técnica, dichos vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, un vector comprenderá un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

20 Pueden emplearse numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que proceden de virus animales, tales como virus del papiloma bovino, virus del poliovirus, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede estar directamente ligado a las secuencias de ADN que se van a expresar o introducir en la misma célula mediante cotransformación. También pueden necesitarse elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de corte y empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales finalizadoras. En algunas realizaciones, los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de cadena pesada y ligera (tales como genes humanos) sintetizados como se ha analizado anteriormente.

En otras realizaciones, un polipéptido glucosilado competente para efector como se describe en el presente documento puede expresarse usando construcciones policistronicas. En dichos sistemas de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés, tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, a partir de una única construcción policistronica. Estos sistemas usan de manera ventajosa un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES, por sus siglas en inglés) para proporcionar niveles relativamente elevados de polipéptidos en células hospedadoras eucariotas. Las secuencias IRES

compatibles se divulgan en la Pat. de EE. UU. N.º 6,193,980, que se incorpora por referencia en el presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión pueden usarse para producir eficazmente la gama completa de polipéptidos divulgados en la presente solicitud.

De manera más general, una vez que se ha preparado un vector o una secuencia de ADN que codifica una proteína de unión de la presente divulgación, el vector de expresión puede introducirse en una célula hospedadora apropiada. Es decir, la célula hospedadora puede transformarse. La introducción del plásmido en la célula hospedadora puede lograrse mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero sin limitación, transfección (incluidas electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus inalterados. Véase, por ejemplo, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors", Capítulo 24.2, págs. 470-472 Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA 1988). Las células transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, y se someten a ensayo para determinar la síntesis de proteínas de las cadenas pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo de ejemplo incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula hospedadora receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En la misma línea, las "células hospedadoras" se refieren a células que se han transformado con vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de polipéptidos de hospedadores recombinantes, el término "célula" y la expresión "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar el origen del anticuerpo, a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar ya sea a partir de células completas centrifugadas o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, la línea de células hospedadoras usada para la expresión de una proteína de unión es de origen eucariota o procariota. En una realización, la línea de células hospedadoras usada para la expresión de una proteína de unión es de origen bacteriano. En una realización, la línea de células hospedadoras usada para la expresión de una proteína de unión es de origen mamífero. Los expertos en la técnica pueden determinar líneas de células hospedadoras particulares que sean las más adecuadas para el producto génico deseado que se va a expresar en las mismas. Las líneas de células hospedadoras de ejemplo incluyen, pero sin limitación, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR minus), HELA (carcinoma de cuello del útero humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano), 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular proporciona una glucosilación alterada, por ejemplo, afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de la misma (por ejemplo, PER.C6®

(Crucell) o líneas celulares CHO con inactivación de FUT8 (células POTELLIGENT™) (Biowa, Princeton, NJ)). En una realización, se pueden usar células NS0. Las líneas de células hospedadoras típicamente están disponibles en servicios comerciales, en la American Tissue Culture Collection o en la bibliografía publicada.

5 La producción *in vitro* permite ampliar la escala para proporcionar grandes cantidades de la proteína de unión deseada. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo tisular se conocen en la técnica e incluyen el cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor de aireación o en un reactor de agitación continua, o el cultivo de células inmovilizadas o atrapadas, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es
10 necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de (inmuno)afinidad.

Uno o más genes que codifican proteínas de unión glucosiladas también se pueden expresar en células no mamíferas, tales como bacterias o levaduras o células vegetales. En este sentido, se apreciará
15 que también se pueden transformar diversos microorganismos unicelulares no mamíferos, tales como bacterias, es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de las enterobacterias, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, las variantes del
20 dominio Fc y/o los polipéptidos de unión pueden convertirse en parte de los cuerpos de inclusión. Las proteínas de unión se deben aislar, purificar y a continuación ensamblar en moléculas funcionales.

Además de procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más comúnmente usada entre los microorganismos eucariotas, aunque hay otras cepas comúnmente disponibles. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa habitualmente, por ejemplo, el plásmido YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como característica del genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

Métodos de uso/tratamiento

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que lo necesite que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína de unión divulgada en el presente documento. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona kits y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos, por ejemplo, un cáncer en un sujeto mamífero que necesita dicho tratamiento. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona kits y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos, por ejemplo, amiloidosis o mieloma múltiple, en un sujeto mamífero que necesita dicho tratamiento.

En determinadas realizaciones, la enfermedad es un cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico. En determinadas realizaciones, el cáncer hematológico es una neoplasia maligna de células plasmáticas. En determinadas realizaciones, la neoplasia maligna de células plasmáticas es mieloma múltiple. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple
5 recidivante/resistente al tratamiento, mieloma múltiple de diagnóstico reciente o mieloma múltiple asintomático. En determinadas realizaciones diferentes, la enfermedad es amiloidosis de cadena ligera (LCA). En determinadas realizaciones, la LCA es LCA recidivante/resistente al tratamiento, LCA de diagnóstico reciente o LCA asintomática. Las proteínas de unión de la presente divulgación son útiles en varias aplicaciones diferentes. Por ejemplo, en una realización, las proteínas de unión en cuestión son
10 útiles para reducir o eliminar células que portan un epítipo reconocido por la proteína de unión. En otra realización, las proteínas de unión en cuestión son eficaces para reducir la concentración de antígeno soluble o eliminarlo de la circulación. En otra realización, las proteínas de unión en cuestión son eficaces como activadores de linfocitos NK. En una realización, las variantes del dominio Fc pueden reducir el tamaño del tumor, inhibir el crecimiento del tumor y/o prolongar el tiempo de supervivencia de los animales
15 portadores de tumores. Por consiguiente, esta divulgación también se refiere a un método para tratar tumores en un ser humano u otro animal mediante la administración a dicho ser humano o animal de una cantidad eficaz y no tóxica de la proteína de unión de la divulgación.

En otra realización, las proteínas de unión en cuestión son útiles para el tratamiento de otros trastornos, incluyendo, sin limitación, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios, trastornos
20 inflamatorios o cáncer. Las enfermedades se pueden especificar opcionalmente como caracterizadas por células (por ejemplo, células causantes de enfermedades, linfocitos B causantes de enfermedades u otras células inmunitarias) que expresan BCMA. Por ejemplo, las células neoplásicas, particularmente cánceres hematológicos o neoplasias malignas de células plasmáticas, se pueden caracterizar por expresar BCMA en la superficie de la célula neoplásica. Por consiguiente, esta divulgación se refiere a un método para tratar diversas afecciones que se beneficiarían del uso de un polipéptido competente para efector en cuestión que tenga, por ejemplo, una semivida mejorada.

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar cuál sería una cantidad eficaz y no tóxica de la proteína de unión para el tratamiento de neoplasias malignas. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una proteína de unión de la presente divulgación puede variar de acuerdo con factores tales como el estadio de la enfermedad (por ejemplo, estadio I frente a estadio IV), la edad, el sexo, las complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunodeprimidas) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo modificado para provocar una respuesta deseada en el sujeto.

En general, las composiciones proporcionadas en la presente divulgación pueden usarse para tratar profiláctica o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprenda un marcador antigénico que permita que la proteína de unión se dirija a las células cancerosas.

Método de tratamiento/Uso para mieloma múltiple

En un aspecto, la divulgación se refiere al tratamiento y la prevención del mieloma múltiple.

La expresión "mieloma múltiple (MM)" (también conocido como mieloma de células plasmáticas, mielomatosis o enfermedad de Kahler) es un cáncer hematológico progresivo de las células plasmáticas, un tipo de glóbulo blanco que normalmente se encarga de producir anticuerpos. La afección se caracteriza por una cantidad excesiva de células plasmáticas en la médula ósea y una sobreproducción de inmunoglobulina monoclonal intacta o cadenas ligeras monoclonales libres. Clínicamente, la enfermedad se diagnostica, se estadifica y se trata en función de una diversidad de parámetros que incluyen la masa de células tumorales del mieloma en función de la cantidad de proteína monoclonal (o mieloma) (proteína M) en el suero o la orina, junto con las concentraciones de hemoglobina y calcio sérico, la cantidad de lesiones óseas líticas en función de un estudio esquelético, y la presencia o ausencia de insuficiencia renal.

Otros enfoques para caracterizar la enfermedad incluyen la detección de más del diez por ciento (10 %) de células plasmáticas en un examen de médula ósea, la presencia de plasmocitomas de tejidos blandos y la detección de cadenas ligeras de inmunoglobulina sérica kappa y lambda libres. El examen de la médula ósea se realiza usando técnicas estándar de histología e inmunohistoquímica. Se pueden realizar estudios citogenéticos adicionales de muestras de médula ósea para determinar el pronóstico. La vigilancia de seguimiento consiste en evaluaciones químicas y de médula ósea si está clínicamente indicado debido a su naturaleza invasiva.

En determinadas realizaciones, los métodos de la invención incluyen el tratamiento de pacientes con MM recidivante y/o resistente al tratamiento o pacientes con MM que han recibido una o más terapias previas para el MM. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante/resistente al tratamiento (RR/MM). En algunas realizaciones, el paciente ha recibido al menos una o dos terapias previas para el mieloma múltiple (por ejemplo, un análogo de la talidomida tal como lenalidomida, un inhibidor del proteasoma o trasplante autólogo de células madre (ASCT, por sus siglas en inglés), y ha demostrado progresión de la enfermedad en la última terapia o después de completar la última terapia.

"MM recidivante" se refiere al mieloma múltiple que ha sido tratado previamente y que progresa y requiere el inicio de un tratamiento adicional pero no cumple con los criterios para el MM "resistente al tratamiento" primario o recidivante y resistente al tratamiento. Los criterios clínicos para determinar la recidiva se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los criterios clínicos desarrollados por el International Myeloma Working Group (IMWG) incluyen aumentos del componente M sérico de >1 g/dl, desarrollo de nuevos plasmocitomas de tejidos blandos o lesiones óseas, y aumentos en el tamaño de los plasmocitomas o lesiones óseas existentes.

"MM resistente al tratamiento" se refiere al mieloma múltiple que no responde al tratamiento (por ejemplo, no logra una respuesta mínima o desarrolla enfermedad progresiva mientras está en terapia). En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple no responde al tratamiento mientras está en terapia primaria o de rescate, o progresa dentro en los 60 días posteriores a la última terapia.

En determinadas realizaciones, el MM es "MM recidivante y resistente al tratamiento". "MM recidivante y resistente al tratamiento" no responde al tratamiento mientras está en terapia de rescate (por ejemplo, terapia que se administra después de que el tratamiento con la primera línea de terapia ha fallado)

o enfermedad que progresa en los 60 días posteriores a la última terapia en pacientes que han logrado una respuesta mínima o mejor en algún momento antes del progreso en su curso actual de la enfermedad.

En determinadas realizaciones, el MM es MM resistente al tratamiento primario. El MM resistente al tratamiento primario es la enfermedad de MM que no responde al tratamiento en pacientes que nunca han logrado una respuesta mínima o mejor con ninguna terapia.

En determinadas realizaciones, el MM es MM preneoplásico o "asintomático". El mieloma múltiple asintomático es una afección preneoplásica que altera determinadas proteínas en la sangre y/o aumenta las células plasmáticas en la médula ósea, pero no causa síntomas de la enfermedad. Sin embargo, aproximadamente la mitad de las personas diagnosticadas con la afección desarrollarán mieloma múltiple en el plazo de 5 años. Los pacientes son monitorizados estrechamente para detectar evidencia de progresión a mieloma múltiple activo. A los pacientes se les diagnostica mieloma múltiple asintomático si cumplen ciertos criterios: un análisis de sangre que muestra una proteína M de >3 g/dl en sangre o un análisis de orina de 24 horas que muestra 500 mg o más de proteína o una biopsia de médula ósea que muestra que las células plasmáticas representan entre el 10 % y el 59 % de las células sanguíneas en la médula ósea; y ningún signo de lesiones óseas anómalas o daño renal que pueda causar el mieloma activo. Actualmente no hay tratamientos aprobados para el mieloma múltiple asintomático.

La "respuesta a la enfermedad" puede determinarse de acuerdo con los criterios estándar para neoplasias hematológicas y la estadificación. Los expertos en la técnica conocen métodos para evaluar la respuesta a la enfermedad de una neoplasia maligna hematológica. Por ejemplo, los métodos para evaluar la respuesta a la enfermedad incluyen evaluaciones del estado funcional, tal como el estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) y los International Myeloma Working Group Response Criteria (véanse Oken, *et al.*, Am. J. Clin. Oncol. 1982;5(6):649-655 y Kumar, *et al.*, Lancet Oncol. 2016; 17(8):328-346, respectivamente). Los métodos para evaluar la respuesta a la enfermedad también pueden incluir la cuantificación de los marcadores de la enfermedad, la biopsia y/o la aspiración de médula ósea, la obtención de imágenes radiológicas del plasmocitoma, el estudio del esqueleto óseo, la cuantificación de la proteína M (suero y/u orina de 24 horas) y los niveles séricos de cadena ligera libre o los niveles urinarios de cadena ligera, la b2-microglobulina sérica, la biopsia de ganglios linfáticos, la evaluación radiológica del tumor (mediante rayos X, tomografía computarizada (TC), exploración PET o resonancia magnética (RM)) y el hemograma, incluido el recuento de blastos. Esta lista de métodos de evaluación debe entenderse como no limitante.

En función de los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la respuesta a la enfermedad, esta puede estratificarse a continuación de acuerdo con los criterios estándar para la enfermedad subyacente y clasificarse en respuesta completa o remisión completa (CR, por sus siglas en inglés), respuesta parcial (PR, por sus siglas en inglés), enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés) o enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir el mieloma múltiple en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión como se divulga en el presente documento, que comprende un primer dominio de antígeno con especificidad de

unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK).

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir el mieloma múltiple en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK), en donde el primer dominio de antígeno comprende:

a. un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y

b. un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX1SSTGX2VTPX3X4YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X1 es R o A, X2 es T o A, X3 es S o G, y X4 es N o Y; una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX5X6PP (SEQ ID NO: 5), en donde X5 es S, I o N y X6 es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X7 es W o Y, X8 es F o Y y X9 es N o G.

En determinadas realizaciones, el primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA comprende:

a. un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y

b. un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX1SSTGX2VTPX3X4YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X1 es R o A, X2 es T o A, X3 es S o G, y X4 es N o Y; una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX5X6PP (SEQ ID NO: 5), en donde X5 es S, I o N y X6 es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X7 es W o Y, X8 es F o Y y X9 es N o G.

En determinadas realizaciones, el VL1 comprende:

a. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSANYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 8), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 9);

b. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CRSSTGTVTPSANYAN (SEQ ID NO: 10), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 12);

c. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 13), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNIKPP (SEQ ID NO: 14), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 15); o

d. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 16), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNNKPP (SEQ ID NO: 17), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 18).

En determinadas realizaciones:

a. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;

b. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

c. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;

d. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52;

e. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o

f. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En determinadas realizaciones:

a. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;

b. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

c. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;

5 d. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52;

e. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o

10 f. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En determinadas realizaciones, el segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos NK comprende:

a. un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH2) que comprende:

15 i. una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYVIN (SEQ ID NO: 80), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIYPGSGTNYNEKFKA (SEQ ID NO: 81), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21);

20 ii. una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 22), una secuencia HCDR2 que comprende YITYSGSTSYNPSLES (SEQ ID NO: 23), y una secuencia HCDR3 que comprende GGYYGSSWGVFAY (SEQ ID NO: 24);

iii. una secuencia HCDR1 que comprende EYTMH (SEQ ID NO: 25), una secuencia HCDR2 que comprende GISPNIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 26), y una secuencia HCDR3 que comprende RGGSFYDY (SEQ ID NO: 27);

iv. una secuencia HCDR1 que comprende SFTMH (SEQ ID NO: 28), una secuencia HCDR2 que comprende YINPSSGYTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 29), y una secuencia HCDR3 que comprende GSSRGFDY (SEQ ID NO: 30); o

v. una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 31), una secuencia HCDR2 que comprende YITYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 32), y una secuencia HCDR3 que comprende CWDYALYAMDC (SEQ ID NO: 33); y

b. un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL2) que comprende:

i. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 34), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YTSRLHS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36);

ii. una secuencia LCDR1 que comprende RVSENIYSYLA (SEQ ID NO: 37), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 38), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYGTPWT (SEQ ID NO: 39);

iii. una secuencia LCDR1 que comprende RASQSDYLH (SEQ ID NO: 40), una secuencia LCDR2 que comprende YASQSI (SEQ ID NO: 41), y una secuencia LCDR3 que comprende QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 42);

iv. una secuencia LCDR1 que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 43), una secuencia LCDR2 que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 44), y una secuencia LCDR3 que comprende QHFWGTPRT (SEQ ID NO: 45); o

v. una secuencia LCDR1 que comprende RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 46), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 47), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYDTPLT (SEQ ID NO: 48).

10 En determinadas realizaciones:

a. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;

15 b. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;

20 c. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

d. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

e. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;

f. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69;

g. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; o

h. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

5 En determinadas realizaciones:

a. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;

b. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;

10 c. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

d. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

15 e. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;

f. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69;

g. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; o

20 h. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la totalidad o parte de un dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, el dominio Fc o una variante del mismo comprende una primera cadena pesada Fc y una segunda cadena pesada Fc. En determinadas realizaciones, la primera cadena pesada Fc o la segunda cadena pesada Fc comprenden el par de cisteínas.

En determinadas realizaciones, el sujeto ha recibido tratamiento o terapia antes del tratamiento con un NKCE como se divulga en el presente documento. En determinadas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple recidivante/resistente al tratamiento.

Método de tratamiento/Uso para la amiloidosis de cadena ligera

En un aspecto, la divulgación se refiere al tratamiento y prevención de la amiloidosis de cadena ligera (LCA).

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona kits y métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos, por ejemplo, una amiloidosis en un sujeto mamífero que necesita dicho tratamiento. Los tratamientos de referencia actuales para la LCA son limitados debido a la tolerabilidad en esta población con disfunción orgánica frecuente. Como tal, todavía existe la necesidad insatisfecha de agentes terapéuticos adicionales para la LCA que sean eficaces y seguros.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la amiloidosis de cadena ligera en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión como se divulga en el presente documento, que comprende un primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK).

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir LCA en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos citolíticos naturales (NK), en donde el primer dominio de antígeno comprende:

a. un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y

b. un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX1SSTGX2VTPX3X4YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X1 es R o A, X2 es T o A, X3 es S o G, y X4 es N o Y; una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX5X6PP (SEQ ID NO: 5), en donde X5 es S, I o N y X6 es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X7 es W o Y, X8 es F o Y y X9 es N o G.

En determinadas realizaciones, el primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA comprende:

a. un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y

b. un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX1SSTGX2VTPX3X4YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X1 es R o A, X2 es T o A, X3 es S o G, y X4 es N o Y; una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX5X6PP (SEQ ID NO: 5), en donde X5 es S, I o N y X6 es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X7 es W o Y, X8 es F o Y y X9 es N o G.

En determinadas realizaciones, el VL1 comprende:

a. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 7), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 8), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 9);

5 b. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 10), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNSRPP (SEQ ID NO: 11), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 12);

10 c. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 13), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNIKPP (SEQ ID NO: 14), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 15); o

 d. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 16), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNNKPP (SEQ ID NO: 17), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 18).

15 En determinadas realizaciones:

 a. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;

20 b. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;

 c. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;

 d. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52;

 e. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o

 f. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1 comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En determinadas realizaciones:

- a. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
5 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55;
- b. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50;
- c. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;
- 10 d. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52;
- e. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53; o
- f. el VH1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49, y en donde el VL1
15 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54.

En determinadas realizaciones, el segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a un marcador de linfocitos NK comprende:

- a. un segundo dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH2) que
comprende:
 - 20 i. una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de DYVIN (SEQ ID
NO: 80), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de EIYPGSGTNYNEKFKA
(SEQ ID NO: 81), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de
RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21);
 - ii. una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 22), una secuencia HCDR2
que comprende YITYSGSTSYNPSLES (SEQ ID NO: 23), y una secuencia HCDR3 que comprende
GGYYGSSWGVFAY (SEQ ID NO: 24);
 - iii. una secuencia HCDR1 que comprende EYTMH (SEQ ID NO: 25), una secuencia HCDR2
que comprende GISPNIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 26), y una secuencia HCDR3 que comprende
RGGSEFDY (SEQ ID NO: 27);
 - iv. una secuencia HCDR1 que comprende SFTMH (SEQ ID NO: 28), una secuencia HCDR2
que comprende YINPSSGYTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 29), y una secuencia HCDR3 que comprende
GSSRGFDY (SEQ ID NO: 30); o
 - v. una secuencia HCDR1 que comprende SDYAWN (SEQ ID NO: 31), una secuencia HCDR2
que comprende YITYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 32), y una secuencia HCDR3 que comprende
CWDYALYAMDC (SEQ ID NO: 33); y
- b. un segundo dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL2) que comprende:
 - i. una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQDISNYLN
(SEQ ID NO: 34), una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de YTSRLHS (SEQ

ID NO: 35), y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36);

ii. una secuencia LCDR1 que comprende RVSENIYSYLA (SEQ ID NO: 37), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 38), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYGTPWT (SEQ ID NO: 39);

iii. una secuencia LCDR1 que comprende RASQSIDYLH (SEQ ID NO: 40), una secuencia LCDR2 que comprende YASQSIG (SEQ ID NO: 41), y una secuencia LCDR3 que comprende QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 42);

iv. una secuencia LCDR1 que comprende RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 43), una secuencia LCDR2 que comprende AATNLAD (SEQ ID NO: 44), y una secuencia LCDR3 que comprende QHFWGTPRT (SEQ ID NO: 45); o

v. una secuencia LCDR1 que comprende RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 46), una secuencia LCDR2 que comprende NAKTLAE (SEQ ID NO: 47), y una secuencia LCDR3 que comprende QHHYDTPLT (SEQ ID NO: 48).

En determinadas realizaciones:

a. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;

b. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;

c. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

d. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

e. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;

f. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y en donde el VL2 comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69;

g. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; o

h. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En determinadas realizaciones:

a. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;

b. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;

c. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;

d. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;

e. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;

f. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69;

g. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70; o

h. el VH2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, y en donde el VL2 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la totalidad o parte de un dominio Fc de inmunoglobulina o una variante del mismo.

En determinadas realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En determinadas realizaciones, el dominio Fc o una variante del mismo comprende una primera cadena pesada Fc y una segunda cadena pesada Fc. En determinadas realizaciones, la primera cadena pesada Fc o la segunda cadena pesada Fc comprenden el par de cisteínas.

En determinadas realizaciones, el marcador de linfocitos NK se selecciona de NKp46, NKp30, NKp44, CD16, CD56, CD57, un receptor KIR (por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2 y KIR3DL3), CD94 y NKG2. En determinadas realizaciones, el marcador de linfocitos NK es NKp46.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la selección de un sujeto con amiloidosis de cadena ligera, en donde la selección comprende:

- a. diagnosticar al sujeto con amiloidosis de cadena ligera;
- b. determinar la estadificación de la enfermedad basándose en un sistema de pronóstico como se divulga en el presente documento; y/o
- c. determinar que el sujeto no ha recibido un diagnóstico previo de mieloma múltiple.

En determinadas realizaciones, el sujeto no ha recibido tratamiento previo.

En determinadas realizaciones, el sujeto ha recibido o está recibiendo uno o más tratamientos para la amiloidosis de cadena ligera (por ejemplo, quimioterapia, trasplante de células madre autólogas, fármacos inmunomoduladores, inmunoterapias, inhibidores del proteasoma y cualquier combinación de los mismos). En determinadas realizaciones, el sujeto ha recibido al menos un inhibidor del proteasoma.

En determinadas realizaciones, la LCA es LCA recidivante/resistente al tratamiento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir LCA en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión que comprende un primer dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a NKp46, en donde:

- a. el primer dominio de antígeno comprende:

- i. un primer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH1) que comprende una secuencia HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1), una secuencia HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de VIWSDETNR (SEQ ID NO: 2), y una secuencia HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de DQQYC SSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3); y

- ii. un primer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL1) que comprende una secuencia LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de CX1SSTGX2VTPX3X4YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X1 es R o A, X2 es T o A, X3 es S o G, y X4 es N o Y; una secuencia LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de DNNX5X6PP (SEQ ID NO: 5), en donde X5 es S, I o N y X6 es R o K, y una secuencia LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ALX7X8GX9QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X7 es W o Y, X8 es F o Y y X9 es N o G; y

- b. el segundo dominio de unión a antígeno comprende:

- i. una secuencia HCDR1 que comprende DYVIN (SEQ ID NO: 19), una secuencia HCDR2 que comprende EIYPGSGTNYNEKFKA (SEQ ID NO: 20), y una secuencia HCDR3 que comprende RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21); y

- ii. una secuencia LCDR1 que comprende RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 34), una secuencia LCDR2 que comprende YTSRLHS (SEQ ID NO: 35), y una secuencia LCDR3 que comprende QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36);

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir LCA en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una proteína de unión que comprende un primer

dominio de antígeno con especificidad de unión a BCMA y un segundo dominio de unión a antígeno con especificidad de unión a NKp46, en donde:

- a. el primer dominio de antígeno comprende:
 - i. un VH1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49; y
 - ii. un VL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; y
- b. el segundo dominio de unión a antígeno comprende:
 - i. un VH2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y
 - ii. un VL1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64.

En determinadas realizaciones, la proteína de unión se administra por vía intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. En determinadas realizaciones, la proteína de unión se administra por vía subcutánea.

En determinadas realizaciones, la variante del dominio Fc comprende mutaciones ADE (G236/S239D/I332E) en CH2 para mejorar la actividad ADCC.

En determinadas realizaciones, la variante del dominio F comprende sustituciones de enlaces disulfuro (R292C/V302C) en CH2 para la estabilización.

En determinadas realizaciones, la variante del dominio Fc comprende mutaciones botón en ojal (KIH) en CH3 para favorecer la formación de heterodímeros en el dominio Fc. En determinadas realizaciones, las mutaciones "botón" están en las posiciones C482/W494 y las mutaciones "ojal" están en las posiciones C129/S146/A148/V187. En algunas realizaciones, la variante del dominio Fc comprende mutaciones RF (H435R/Y436F) en un CH3 para favorecer la purificación de heterodímeros en el dominio Fc.

En determinadas realizaciones, la enfermedad es una amiloidosis o una enfermedad amiloide. Como se usa en el presente documento, el término "amiloidosis" o la expresión "enfermedad amiloide" se refieren a enfermedades o trastornos que se incluyen en el marco de las discrasias de células plasmáticas. La amiloidosis o enfermedad amiloide se produce cuando el amiloide se acumula en los órganos e interfiere con la función fisiológica normal. Como se usa en el documento, el término "amiloide" se refiere a los depósitos proteínicos extracelulares fibrosos anómalos que se encuentran en los órganos y tejidos. El amiloide normalmente no se encuentra en el cuerpo, pero puede formarse a partir de varios tipos diferentes de proteínas. El amiloide es típicamente insoluble y está dominado estructuralmente por una estructura de lámina β . Los órganos que pueden verse afectados incluyen el corazón, los riñones, el hígado, el bazo, el sistema nervioso, la piel y el tubo digestivo. El término "amiloidosis" se usa para referirse a un conjunto de enfermedades que comparten una característica común, es decir, la deposición extracelular de proteínas fibrilares insolubles patológicas en órganos y tejidos.

Una característica distintiva de la enfermedad amiloide es la producción de amiloides caracterizados por una morfología fibrilar de aproximadamente 5-15 nm de diámetro que se unen al colorante rojo Congo y muestran birrefringencia fluorescente cuando se unen al colorante tioflavina T. Las fibras pueden formar estructuras secundarias llamadas protofilamentos hechos de láminas β plegadas que las hacen resistentes a la degradación. Toyama y Weissman (2011), *Annu Rev Biochem*, 80:557-585; Picken (2020), *Acta Haematol*, vol. 143: 322-334.

En determinadas realizaciones, la amiloidosis o la enfermedad amiloide es amiloidosis de cadena ligera o amiloidosis de cadena ligera amiloide. La clasificación actual de amiloide se basa en el tipo de proteína amiloide. Por ejemplo, el amiloide se denomina "A" (por amiloide) seguido de una abreviatura del tipo de proteína: AL (amiloide procedente de la cadena ligera de inmunoglobulina). La expresión "amiloidosis de cadena ligera amiloide" o "amiloidosis de cadena ligera" o "LCA"; también llamada amiloidosis AL, AL, ALA o amiloidosis primaria AL, es la forma más común de amiloidosis sistémica en los Estados Unidos y en los países desarrollados. Picken (2020), *Acta Haematol*, vol. 143: 322-334. El paciente puede presentar una primera instancia de LCA (LCA recién diagnosticada), o la LCA puede ser recidivante y/o resistente al tratamiento (LCA recidivante/resistente al tratamiento). La LCA es la forma más común de amiloidosis sistémica y está asociada con una discrasia de células plasmáticas subyacente. Las células plasmáticas aberrantes procedentes de una única fuente de células plasmáticas y secretan cadenas ligeras libres formadoras de fibrillas tóxicas. Se ha demostrado que estas células plasmáticas son BCMA-positivas (Godara *et al.* 2019. *Blood* 134 (Suplemento 1): 4409). En determinadas realizaciones, el paciente con LCA no ha recibido tratamiento previo. En algunas realizaciones, el paciente con LCA ha recibido o está recibiendo uno o más tratamientos para la amiloidosis de cadena ligera (por ejemplo, quimioterapia, trasplante de células madre autólogas, fármacos inmunomoduladores, inmunoterapias, inhibidores del proteasoma y cualquier combinación de los mismos).

En determinadas realizaciones, la proteína de unión, incluyendo las que comprenden variantes del dominio Fc, son útiles en varias aplicaciones diferentes. Por ejemplo, en una realización, las proteínas de unión en cuestión son útiles para reducir o eliminar células que portan un epítipo reconocido por el dominio de unión de la variante del dominio Fc. En otra realización, las variantes del dominio Fc en cuestión son eficaces para reducir la concentración o eliminar el antígeno soluble de la circulación. En otra realización, las variantes del dominio Fc en cuestión son eficaces como activadores de linfocitos T.

En otra realización, las proteínas de unión en cuestión, incluyendo las que comprenden variantes del dominio Fc, son útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con un linfocito B monoclonal aberrante o una célula plasmática. En una realización, el linfocito B monoclonal aberrante o la célula plasmática expresa BCMA.

Las proteínas de unión pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno dentro de la categoría de discrasias de células plasmáticas. En una realización, la discrasia de células plasmáticas no es mieloma múltiple. En una realización, la discrasia de células plasmáticas es una amiloidosis, por ejemplo, LCA (también denominada amiloidosis de cadena ligera, amiloidosis AL (primaria), amiloidosis sistémica, AL o ALA).

La LCA es un trastorno hematológico causado principalmente por células plasmáticas clonales que producen cadenas ligeras de inmunoglobulina mal plegadas. Estas cadenas ligeras aberrantes forman un agregado tóxico en las células plasmáticas y depositan fibrillas (amiloides) en órganos y tejidos que dan como resultado una disfunción orgánica significativa y, a veces, permanente. La LCA puede afectar a cualquier órgano distinto del cerebro. Li *et al.* (2019), *J Int Med Res.*, 47(4): 1778-1786. Los mecanismos por los cuales las cadenas ligeras de inmunoglobulina amiloidogénicas provocan disfunción orgánica no están bien caracterizados, pero es probable que se deban a los efectos citotóxicos de los depósitos de amiloide y los agregados prefibrilares en el órgano u órganos subyacentes. La LCA primaria es aquella que no está asociada con el mieloma múltiple ni se considera una complicación del mismo.

Los síntomas dependen del órgano subyacente afectado y generalmente se reconocen en una etapa tardía de la progresión de la enfermedad. Los primeros signos y síntomas de la LCA incluyen, pero sin limitación, hinchazón de tobillos y piernas; fatiga y debilidad intensas (por ejemplo, falta de aliento; entumecimiento, hormigueo o dolor en las manos o los pies), diarrea o estreñimiento, pérdida de peso significativa e involuntaria; agrandamiento de la lengua, cambios en la piel (tal como engrosamiento o fácil aparición de hematomas o manchas violáceas alrededor de los ojos), ritmo cardíaco irregular o dificultad para tragar. Las características clínicas de la LCA más grave incluyen afectación y/o disfunción cardíaca, renal, hepática y gastrointestinal, así como neuropatías y macroglosia. La afectación cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca y arritmias) es el síntoma más común de la LCA y representa la característica pronóstica más adversa. Bianchi *et al.* (2021), *Cardiooncology*, vol. 3: 4.

Los criterios de diagnóstico de la LCA incluyen (1) la presencia de un síndrome sistémico, (2) documentación histológica de amiloide, (3) evidencia de un trastorno de células plasmáticas monoclonales (por ejemplo, basado en la médula ósea o aspirado de grasa y/o biopsia del objetivo y parámetros serológicos), y (4) tipificación de la amiloidosis para la identificación de la cadena ligera de Ig (por ejemplo, mediante LC-MS o microscopía inmunoelectrónica). Koh (2020) *Blood Res.*, 55(Suppl): S54-S57.

El resultado de la enfermedad para los pacientes con LCA se puede predecir basándose en un sistema de pronóstico de múltiples etapas. Actualmente existen cuatro modelos de pronóstico diferentes: (1) Modelo Mayo 2004 (Dispenzieri *et al.* (2004), *J Clin Oncol.*, vol. 22:3751-7); (2) Modelo Mayo 2012 (Kumar *et al.* (2012), *J Clin Oncol.*, vol. 30:989-95); (3) Modelo Europeo 2015 (Muchtar *et al.* (2019), *Leukemia*, vol. 33:811-4); (4) Puntuación de la Universidad de Boston 2019 (Lillenness *et al.* (2019), *Blood*, vol. 133:215-23). El Modelo Mayo 2012 y el Modelo Europeo 2015 han demostrado el mejor rendimiento predictivo en estudios de validación recientes. Vaxman *et al.* (2020) *Blood Rev*, 40: 100636.

El trasplante autólogo de células madre (ASCT) es el tratamiento más eficaz para los pacientes con LCA. Sanchorawala (2020), *Acta Haematol*, vol. 143: 381-387. Los biomarcadores cardíacos para la evaluación de la elegibilidad para el ASCT a menudo se ensayan como niveles de troponina T >0.06 ng/ml o niveles de NT-proBNP >5000 ng/l que se asocian con una alta mortalidad relacionada con el trasplante. Gavriatopoulou *et al.* (2018), *Leukemia*, vol. 32:1183-1898. La mayoría de los pacientes con LCA no son aptos para el trasplante de células madre, pueden recibir quimioterapia única o combinada y/o regímenes de inmunoterapia para erradicar la célula plasmática subyacente. Para los pacientes de riesgo intermedio,

el tratamiento estándar ha sido melfalán/dexametasona oral (Mdex), régimen basado en bortezomib (BMDex o VCD). Sin embargo, la mortalidad relacionada con el tratamiento es sustancial (24 %). Id. Los pacientes que no logran tasas de respuesta rápida son considerados para tratamientos de segunda línea, concretamente, fármacos inmunomoduladores (IMiD). Los IMiD incluyen talidomida, lenalidomida y pomalidomida, y combinaciones de los mismos con agentes alquilantes. Sin embargo, las inmunoterapias son mal toleradas en los pacientes, particularmente aquellos con LCA cardíaca. Sidiqi y Gertz (2021), Blood Cancer Journal, vol. 11: 90. En general, los regímenes de tratamiento de la LCA en uso actualmente suelen ser difíciles de tolerar por el paciente y los pacientes a menudo sucumben a los efectos secundarios duraderos de los tratamientos que con frecuencia mejoran los síntomas de la enfermedad. Hassan y Sanchorawala (2022), Hemato, vol. 3: 38-46. Más recientemente, daratumumab (anti CD38)-VCD ha sido aprobado como terapia estándar en pacientes con LCA recién diagnosticados, según el estudio ANDROMEDA de fase 3 (NCT03201965) (Kastritis *et al.* 2021. NEJM, 385:46-58).

Una cantidad terapéuticamente eficaz del activador de linfocitos NK divulgado en el presente documento puede ser la dosis o cantidad suficiente para inducir una "respuesta terapéutica" en un sujeto, tal como una mejora en al menos una medida de la enfermedad amiloide, tal como una reducción en el tamaño de los depósitos o placas amiloides existentes, una disminución en la tasa de deposición amiloide o una función orgánica mejorada medida mediante técnicas estándar. A continuación, se resumen ejemplos de signos de presentación comunes específicos de órganos diana comunes y ejemplos de función orgánica mejorada.

Corazón

Los signos de presentación más comunes de los depósitos de amiloide son disnea de esfuerzo, ortopnea, disnea paroxística nocturna, edema de las extremidades inferiores, derrames pleurales, distensión venosa yugular, arritmia, síncope y angina. Una disminución en el nivel de la proteína natriurética tipo b (NT-proBNP) del extremo N del paciente o una disminución en el nivel de la clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA) del paciente pueden ser indicaciones de una mejoría cardíaca. Palladini *et al.* (2003), Circulation, vol. 107: 2440-2445. La mejoría de la función cardíaca también puede evaluarse midiendo los niveles de troponina cardíaca, analizando la RMN cardíaca y el ecocardiograma.

Riñón

Los signos de presentación más comunes de los depósitos de amiloide en los riñones son el edema de las extremidades inferiores, la anasarca y la uremia. Una disminución de la proteinuria o de la tasa de eliminación de proteínas en la orina y de la tasa de filtración glomerular estimada (TFGe) pueden ser indicaciones de una mejoría de la función renal. Kidney Int. Suppl (2011), vol. 3(1): 19-62.

Hígado

Los signos de presentación más comunes de los depósitos de amiloide en el hígado son dolor en el cuadrante superior derecho, hepatomegalia, ascitis y/u oliguria. La mejora de los niveles de fosfatasa alcalina (ALP) y de los niveles séricos de γ -glutamilttransferasa (GGT) pueden ser indicaciones de una mejoría de la función hepática. La mejora de otras métricas, tales como la hiperlipidemia, las anomalías de la coagulación, la trombocitopenia, el tiempo de protrombina (TP), la velocidad de sedimentación globular,

la alanina aminotransferasa (ALT) y/o la aspartato aminotransferasa (AST), la albúmina sérica y los niveles de fragmentos del complemento también pueden indicar una mejoría de la función hepática, cuando estos parámetros se evaluaron antes de cualquier tratamiento, ya que carecen de especificidad para la amiloidosis hepática. Park *et al.* (2003), *Medicine*, vol. 82(5): 291-298.

5 **Tubo GI**

Los síntomas de presentación comunes de los depósitos de amiloide en el tubo gastrointestinal (GI) son pérdida de motilidad, hemorragia gastrointestinal, malabsorción, pérdida de peso, anorexia, vómitos, náuseas, hematomas, erosiones y ulceraciones o gastritis nodular. La función mejorada del tubo gastrointestinal puede evaluarse usando técnicas de imagen convencionales (por ejemplo, ecografía, exploración por tomografía computarizada, rayos X, endoscopia).

Sistema nervioso

Los síntomas más comunes de los depósitos de amiloide en las proximidades de los nervios o en su interior son la polineuropatía sensoriomotora, caracterizada por síntomas de dolor neuropático, entumecimiento y, en casos avanzados, debilidad. La mejoría de la función del sistema nervioso puede evaluarse mediante pruebas electrofisiológicas, tales como estudios de conducción nerviosa (NCS), electromiografía (EMG), pruebas de función autónoma (AFT) y pruebas cuantitativas del reflejo axónico sudomotor (QSART).

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar cuál sería una cantidad eficaz y no tóxica de proteína de unión o variante del dominio Fc para tratar la LCA. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una proteína de unión, incluyendo las que comprenden una variante del dominio Fc de la presente divulgación, puede variar de acuerdo con factores tales como el sistema de estadificación pronóstica, la edad, el sexo, las complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunodeprimidas) y el peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo modificado para provocar una respuesta deseada en el sujeto. La pauta posológica puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente, o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

En general, las composiciones proporcionadas en la presente divulgación pueden usarse para tratar profiláctica o terapéuticamente cualquier neoplasia que comprenda un marcador antigénico que permita el direccionamiento de las células neoplásicas por parte de la proteína de unión, incluidas las que comprenden una variante del dominio Fc.

Las proteínas de unión de la presente divulgación se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de proteína de unión o antígeno en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración plasmática de polipéptido de unión modificada de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg/ml. Como alternativa, las proteínas de unión se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. Para los anticuerpos, la dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el

paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos.

La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes polipéptidos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que aún no tiene la patología para mejorar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profiláctica eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado de salud del paciente y de su inmunidad general, pero generalmente varían de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25 mg por dosis, especialmente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.5 mg por dosis. Se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de su vida. En las aplicaciones terapéuticas, con frecuencia se requiere una dosis relativamente alta (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, usándose más comúnmente dosis de aproximadamente 5 a 25 mg para radioinmunoconjugados y dosis más altas para anticuerpos modificados con citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, o hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar una pauta profiláctica.

Las proteínas de unión, incluidas las que comprenden variantes de Fc, de la presente divulgación se pueden administrar opcionalmente junto con otros agentes que son eficaces para tratar el trastorno o la afección que necesita tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Las dosis de tratamiento individuales eficaces (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos modificados marcados con ^{90}Y de la presente divulgación varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis individuales no ablativas de la médula ósea de tratamiento eficaces de anticuerpos modificados con ^{131}I varían de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosis individuales ablativas de tratamiento eficaces (es decir, que pueden requerir un trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos marcados con ^{131}I varían de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, tal como entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico, debido a la semivida circulante más prolongada de los anticuerpos murinos I, un tratamiento individual eficaz de dosis no ablativas de médula ósea de anticuerpos quiméricos marcados con yodo- ^{131} varía de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, tal como menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de obtención de imágenes para, por ejemplo, la etiqueta ^{111}In , son típicamente de menos de aproximadamente 5 mCi.

Si bien las proteínas de unión pueden administrarse como se acaba de describir anteriormente, debe enfatizarse que, en otras realizaciones, el polipéptido puede administrarse a pacientes por lo demás sanos como terapia de primera línea. En dichas realizaciones, las proteínas de unión pueden administrarse a pacientes que tienen reservas de médula roja normales o promedio y/o a pacientes que no han recibido tratamiento y no lo están recibiendo. Como se usa en el presente documento, la administración de los

polipéptidos junto con una terapia auxiliar significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los anticuerpos divulgados. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado puede programarse para mejorar la eficacia general del tratamiento.

5 Como se ha analizado previamente, las proteínas de unión, incluidas las que comprenden variantes de Fc, de la presente divulgación, anticuerpos, polipéptidos terapéuticos o polipéptidos de fusión de variantes de Fc de los mismos, pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos en mamíferos. En este sentido, se apreciará que las proteínas de unión divulgadas se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo.

10 **Composiciones farmacéuticas y administración de las mismas**

Los métodos para preparar y administrar la proteína de unión de la presente divulgación a un sujeto se conocen bien o se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de los polipéptidos de unión de la presente divulgación puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. Como se usa en el presente documento, el término parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, 15 intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance de la presente divulgación, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intraarterial o goteo o para administración subcutánea. Por lo general, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, 20 polisorbato), opcionalmente un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. En algunas realizaciones, las variantes del dominio Fc se pueden suministrar directamente al sitio de la población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. En las composiciones y métodos de la presente divulgación, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfato 0.01-0.1 M, por ejemplo, 0.05 M, o una solución salina al 0.8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. En dichos casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida en el grado en que exista una fácil capacidad para introducirlo en la jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y, típicamente, se conservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o

un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

En muchos casos, se incluirán agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, una proteína de unión de la divulgación) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación de ejemplo incluyen secado al vacío y liofilización, que produce un polvo de un principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente estéril del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se llenan en recipientes, tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y vender en forma de un kit. Dichos artículos de fabricación tendrán típicamente etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a padecer trastornos autoinmunitarios o neoplásicos.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Por lo general, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento pueden valorarse usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un portador estéril, no tóxico y farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. A los efectos de la presente solicitud, se entenderá por cantidad farmacéuticamente eficaz de la proteína de unión una cantidad suficiente para lograr una unión eficaz a un antígeno y lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de células tumorales, el polipéptido puede interactuar con antígenos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la

muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido de unión modificado.

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, las proteínas de unión de la divulgación pueden administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Las proteínas de unión de la divulgación se pueden administrar a dicho ser humano u otro animal en una forma farmacéutica convencional preparada combinando el anticuerpo de la divulgación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional de acuerdo con técnicas conocidas. Un experto en la técnica reconocerá que la forma y el carácter del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable se determina por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica apreciarán además que un cóctel que comprenda una o más especies de polipéptidos de unión descritos en la presente divulgación puede resultar particularmente eficaz.

El contenido de los artículos, patentes y solicitudes de patente, y todos los demás documentos e información electrónicamente disponibles mencionados o citados en el presente documento, se incorporan por referencia en su totalidad en la misma medida que si se hubiera indicado específicamente e individualmente que cada publicación individual se incorporara por referencia. Los Solicitantes se reservan el derecho de incorporar físicamente a esta solicitud todos y cada uno de los materiales e información de dichos artículos, patentes, solicitudes de patente u otros documentos físicos y electrónicos.

Si bien la presente divulgación se ha descrito con referencia a las realizaciones específicas de la misma, los expertos en la técnica deben entender que se pueden realizar diversos cambios y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la divulgación. Resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica que pueden realizarse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descritos en el presente documento usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de las reivindicaciones divulgadas en el presente documento. Además, se pueden realizar muchas modificaciones para adaptar una situación, material, composición de materia, proceso, etapa o etapas de proceso particulares, al objetivo, espíritu y alcance de la presente divulgación. Todas estas modificaciones pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Habiendo descrito ahora determinadas realizaciones en detalle, las mismas se entenderán más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solamente para fines de ilustración y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

La presente divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

Hasta la fecha, la terapia antitumoral se ha centrado en la manipulación de linfocitos T efectores. Los formatos de activadores de linfocitos T se encuentran en desarrollo clínico, pero su uso se limita a enfermedades hematológicas debido a la toxicidad potencial. Por el contrario, la manipulación de linfocitos NK en el cáncer a través de NKCE es una alternativa terapéutica debido al potencial efector antitumoral de los linfocitos NK y al perfil de toxicidad favorable en comparación con los linfocitos T efectores. La **figura 1A** es un esquema del NKp46 NKCE que se une con un brazo a un antígeno en la superficie de la célula tumoral y con otro brazo al receptor NKp46 en los linfocitos NK.

Un NKp46 NKCE genomanipulado con un formato Fc único (es decir, un NKp46-BCMA_ CODV-OL1_Fc-ADE-DSB) como se muestra en la **figura 1B** activa BCMA en la superficie de la célula tumoral mientras que también activa tanto NKp46 como un receptor Fcγ, CD16a. La actividad ADCC se induce con su novedoso formato competente para Fc mejorado. El novedoso formato competente para Fc mejorado (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "CODV-OL1-ADE-DSB") incluye: (1) mutaciones ADE (G236A/S239D/I332E) en CH2 para mejorar la actividad ADCC; (2) DSB (R292C/V302C) en CH2 para la estabilización térmica; (3) mutaciones botón en ojal (KIH, por sus siglas en inglés) en CH3 para favorecer la formación de heterodímeros en Fc - (3a) botón (en la cadena pesada que contiene los dominios VH/VL): S354C/T366W y (3b) ojal (en la cadena pesada que carece de los dominios VH/VL): Y349C/T366S/L368A/Y407V; y (4) mutaciones RF (H435R/Y436F) en CH3 para favorecer la purificación de heterodímeros en Fc. Este NKp46-BCMA NKCE_Fc CODV-OL1-ADE-DSB contiene además dos enlazadores GGGGSGGGGS en la cadena ligera: uno entre VL anti BCMA y VL anti NKp46 y entre VL NKp46 y CL.

Materiales y métodos: Proteína humana recombinante, clonación, producción, purificación

NKp46 humano recombinante: Clonación, producción y purificación

La secuencia que codifica el dominio extracelular (ECD) de NKp46 humano (Gln22-Asn255, referencia NCBI: NM_004829.5) se insertó en el vector de expresión y se añadió una etiqueta 6xHis en el extremo C para la purificación. Se usaron los siguientes cebadores para el análisis por PCR en PBMC humanas: 5' TACGACTACAAGCTTGCCGCCACCATGTCTTCCACACTCCCTGC 3' (SEQ ID NO: 107) y 5' CCGCCCCGACTCTAGATCAATGGTGATGGTGGTGATGATTCTGGGCAGTGTGATCCC 3' (SEQ ID NO: 108). Se verificó la secuencia del amplicón. A continuación, el vector se usó para transfectar una línea celular CHO y se seleccionó un clon que producía la proteína. La proteína se purificó a partir del sobrenadante de cultivo con perlas de Ni-NTA (Qiagen, n.º 1018244) y se realizó un análisis por cromatografía de exclusión por tamaño S200 para garantizar la eliminación de agregados antes de la caracterización de la interrogación cadena abajo de la cinética de unión con resonancia de plasmón superficial (SPR).

La secuencia que codificaba el ECD de NKp46 de macaco cangrejero (Pro22-Asn254, NP_001271509.1) se clonó en un vector de expresión y se añadió una etiqueta Flag-M2 en el extremo C para su purificación. Los cebadores usados para amplificar la secuencia esperada de PBMC de macaco

cangrejero fueron: 5' TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGTCTTCCACACTCCGTGC 3' (SEQ ID NO: 109) y 5'

CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCATTCTGGGCAGTGTGGTCC 3' (SEQ ID NO: 110). Después de la validación de secuencias, el vector se usó para transfectar la línea celular

5 CHO-K1SV y se seleccionó un clon celular productor. Los primeros tres lotes se purificaron mediante cromatografía de afinidad M2. Las perlas se incubaron con el sobrenadante que contenía la proteína recombinante durante una noche. A continuación, las perlas se lavaron con PBS 1x y la elución se realizó con péptido de elución a razón de 150 ng/μl en PBS 1x. A continuación, las proteínas se dializaron contra PBS 1x. Los siguientes lotes se purificaron mediante cromatografía de afinidad mediante el acoplamiento
10 de un anticuerpo anti NKp46 a la resina de acoplamiento AminoLink de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare, n.º 20381, lote QB213815). A continuación, las perlas se incubaron con el sobrenadante que contenía la proteína recombinante durante una noche. A continuación, las perlas se lavaron con PBS 1x y la elución se realizó usando glicina 0.1 M a pH 2.5. A continuación, las proteínas se dializan contra un tampón TBS a pH 7.5 y se concentran para realizar una cromatografía de exclusión por
15 tamaño preparativa en una columna Superdex 200 Increase 10/300 GL.

BCMA humano recombinante: Clonación, producción y purificación

Para la generación de BCMA humano recombinante (TNFRSF17), se solicitó a Atum (Newark, CA, EE. UU.) un fragmento de ADN sintético optimizado con codones HEK293 que codificaba el dominio extracelular de BCMA humano fusionado con el fragmento A de la toxina de la difteria (DTA) y una etiqueta
20 de purificación His6. A continuación, el fragmento de ADN sintético se clonó en un vector de expresión de mamífero pTT5 usando la tecnología Gateway® Cloning (Life Technologies - ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.) para generar un plásmido recombinante para la expresión heteróloga en células de mamífero.

Las células Expi293F (ThermoFisher) se transfectaron con el ADN plasmídico usando el protocolo disponible comercialmente. Las células se recogieron después de 6 días de crecimiento y el medio acondicionado (CM, por sus siglas en inglés) se recogió por centrifugación. La proteína se purificó usando agarosa Ni-NTA (Qiagen). La resina se equilibró en PBS a pH 7.2 tres veces centrifugando durante 5 min a 1000 x g con decantación/agregación de PBS recién preparado cada vez. La resina equilibrada se añadió a un frasco giratorio con el CM y se giró durante 1 hora a temperatura ambiente. Se usó 1 ml de resina por cada 200 ml de medio acondicionado. Después de la incubación, la suspensión de CM/resina se vertió en una columna de caída por gravedad y se lavó con 10 VC de PBS a pH 7.2. La proteína se eluyó con 10 VC de imidazol 600 mM en PBS. El eluato se intercambió con tampón en PBS a pH 7.2 y se concentró usando un filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Millipore). El análisis por SEC preparativa se realizó usando una columna Superdex 200 (16/60) (Cytiva Life Sciences) en PBS. La muestra final se agrupó y se concentró en PBS hasta una concentración final de >5 mg/ml.

Moléculas CODV-OL1: Producción y purificación

Los plásmidos de expresión que codificaban las diferentes cadenas de las construcciones correspondientes se propagaron en DH5a de *E. coli*. Los plásmidos usados para la transfección se prepararon a partir de *E. coli* con kits EndoFree Plasmid Mega (Qiagen).

- 5 Las células HEK 293-FS que crecían en un cultivo en suspensión sin suero F17 (Invitrogen) se transfectaron con los plásmidos indicados usando el reactivo de transfección de polietilenimina. Después de 6 días de cultivo a 37 °C con CO₂ al 8 %, las células se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 µm para eliminar las partículas.

- 10 Las proteínas se capturaron en MabSelect SuRe (Cytiva), se eluyeron con un tampón de citrato 0.1 M a pH 3.0 y se neutralizaron con Tris 1 M a pH 9. Después de pulir las proteínas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando Superdex200 26/60 (Cytiva) y una filtración de 0.22 µm y la determinación de la concentración con UV280, las proteínas se usaron para una caracterización adicional.

Muestras de control recombinantes

- 15 Las proteínas recombinantes humanas y de macaco cangrejero que se enumeran a continuación se produjeron y se purificaron en Innate Pharma como se ha descrito previamente (LG Cell 2019): NKp46 humano (Gln22-Asn255, referencia NCBI: NM_004829.5), receptor Fc neonatal humano (FcRn, referencia NCBI: P55899), CD16a (isoformas V y F de FcγRIIIA humano, referencia NCBI: AAH36723), CD32a humano (FcγRIIA humano, referencia NCBI: AAH20823), CD32b humano (FcγRIIB humano, referencia NCBI: NP_003992), CD16b humano (FcγRIIIB humano, referencia NCBI: AAI28563), CD64 humano (FcγRI humano, referencia NCBI: P12314), NKp46 de macaco cangrejero (Gln17-Asn254, NP_001271509.1), FcRn de macaco cangrejero (referencia NCBI: Q8SPV9), CD16 de macaco cangrejero (referencia NCBI: NP_001270121.1), CD32a de macaco cangrejero (referencia NCBI: NP_001270598.1), CD32b de macaco cangrejero (referencia NCBI: NP_001271060.1) y CD64 de macaco cangrejero (referencia NCBI: AAL92095.1). El BCMA humano recombinante se adquirió en ACRO Biosystems.

Tabla 1. CDR anti NKp46-1 de ejemplo

	Kabat	IMGT	Chothia	Honegger
CDR L1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 34)	QDISNY (SEQ ID NO: 96)	SQDISNY (SEQ ID NO: 97)	ASQDISNY (SEQ ID NO: 98)
CDR L2	YTSRLHS (SEQ ID NO: 35)	YTS (SEQ ID NO: 99)	YTS (SEQ ID NO: 100)	YTSRLHSGVPSR (SEQ ID NO: 101)
CDR L3	QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36)	QQGNTRPWTF (SEQ ID NO: 102) o QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 111)	GNTRPW (SEQ ID NO: 103)	GNTRPW (SEQ ID NO: 104)

CDR H1	DYVIN (SEQ ID NO: 80)	GYTFSDYV (SEQ ID NO: 87)	GYTFSDY (SEQ ID NO: 88)	ASGYTFSDYV (SEQ ID NO: 89)
CDR H2	EIYPGSGTNYYNEKF KA (SEQ ID NO: 81)	IYPGSGTN (SEQ ID NO: 90)	PGSG (SEQ ID NO: 91)	IYPGSGTNYYNEKFKA K (SEQ ID NO: 92)
CDR H3	RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21)	ARRGRYGLYAMDY SEQ ID NO: 93)	GRYGLYAMD (SEQ ID NO: 94)	RGRYGLYAMD (SEQ ID NO: 95)

Ejemplo 2: Determinación de la densidad del receptor BCMA en un panel de líneas celulares de mieloma mielóide

Introducción

Se ha propuesto la expresión del antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA) como marcador para la identificación de células plasmáticas neoplásicas en pacientes con mieloma múltiple (MM). Casi todas las células tumorales de MM expresan BCMA, mientras que la expresión en el tejido normal se limita a las células plasmáticas y a un subconjunto de linfocitos B maduros. Friedman *et al.* (2018) Hum Gene Ther. 29(5): 585-601. Para determinar la cantidad de moléculas de BCMA por célula, se usó un ensayo del receptor BCMA basado en citometría de flujo para cuantificar la expresión superficial de BCMA y, posteriormente, seleccionar las líneas celulares de MM que serían opciones adecuadas para el análisis cadena abajo de los anticuerpos BCMA.

En la **Tabla 2** a continuación se muestra una lista de las líneas celulares de MM usadas en este estudio.

Tabla 2: Panel de líneas celulares de MM

Nombre de la línea celular de MM	Banco de células
H929	ATCC
U266	DSMZ
OPM2	DSMZ
MM1R	ATCC
JJN3	DSMZ
KMS12BM	DSMZ
L363	DSMZ
RPMI 8226	ATCC
LP1	DSMZ
MOLP8	Immunogen
MM1S	ATCC
KMS11	JCRB
EJM	DSMZ

Materiales y métodos: Procedimiento analítico para la determinación de la capacidad de unión a antígeno para determinar la expresión de BCMA en la superficie de líneas celulares de MM mediante citometría de flujo.

Configuración experimental

- 5 Para la determinación de la densidad de BCMA, se usó el calibrador CELLQUANT (Biocytex, ref: 7208). Primero, se sembraron 200,000 células de MM (véase la lista a continuación para todas las líneas celulares ensayadas) en placas de fondo redondo de 96 pocillos (TPP, Trasadingen, ref. 92097) en 100 ml de reactivo 1 a 1x (diluido a 1/10 en agua destilada) + 10 ml de reactivo de bloqueo de FcR, humano (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, ref. 130-059-901) durante 15 min a 4 °C.
- 10 A continuación, las células de MM se centrifugaron durante 5 min a 300 g antes de eliminar el sobrenadante. Se añadieron 50 ml de anticuerpo anti BCMA humano de ratón a razón de 10 mg/ml antes de una incubación de 30 min a 4 °C (BD BioLegend, clon 19F2, ref. 357502, concentración de solución madre a 0.5 mg/ml, dilución 1/50 mezclando 5 ml de anti BCMA con 245 ml de Reactivo 1 a razón de 1x).
- 15 Para el isotipo de control, se añadieron 50 ml de control de isotipo kappa de IgG2a de ratón purificado a 10 mg/ml antes de una incubación de 30 min a 4 °C (BD BioLegend, ref 400201, concentración de solución madre a 0.5 mg/ml, dilución 1/50 mezclando 5 ml de IgG2a con 245 ml de reactivo 1 a razón de 1x).
- 20 Se realizaron dos etapas de lavado consecutivas añadiendo 200 ml de Reactivo 1 a razón de 1x en los pocillos seguidas de centrifugación a 2000 rpm durante 1 min a 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, las células se suspendieron de nuevo en 50 ml de anticuerpo secundario anti IgG FITC de ratón (Reactivo 3 del kit Biocytex, ref. 7208, para 15 ml usar 1.5 ml de Reactivo 3 + 13.5 ml de Reactivo 1), previamente diluido 1/10 en el Reactivo 1 a razón de 1x. Se añadieron 50 ml que contenían perlas de calibración en los pocillos dedicados a la calibración (Reactivo 2 del kit Biocytex) y finalmente se añadieron 5 ml de Reactivo 3 a los pocillos de calibración (sin diluir) para que estuvieran en las mismas condiciones de tinción que las células. A continuación, la placa de 96 pocillos se incubó durante 20 min a 4 °C, protegida de la luz.
- Se realizaron tres etapas de lavado consecutivas añadiendo 200 ml de Reactivo 1 a razón de 1x en los pocillos, seguidas de centrifugación a 2000 rpm durante 1 min a 4 °C. Después de eliminar el sobrenadante, las células se suspendieron de nuevo en 100 ml de PBS frío antes de leerlas con el analizador MACSQuant 10 o MACSQuant VYB (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). La adquisición se realiza en un canal B1 para tinción con FITC y en un canal V1 para tinción con DAPI (marcador de viabilidad celular).

Cálculo de la densidad de BCMA

Para determinar la densidad de BCMA en líneas celulares de MM en función de la fluorescencia de FITC, se usó la información de las perlas de calibración para generar una curva de calibración lineal como se muestra en la **Tabla 3** a continuación.

Tabla 3: Tinción de perlas con capacidad de unión a antígeno para crear una curva estándar

Perlas	Número de sitios	MFI FITC
A	770	386.87
B	5 500	2996.01
C	33 000	18861.1
D	173 000	103844.3

Perlas	Log (FITC)	Log (Nb de sitios)
A	2.59	2.89
B	3.48	3.74
C	4.28	4.52
D	5.02	5.24

Datos de la curva (y = ax + b)	
Pendiente (a)	0.9686
Intercepto (b)	0.3772
r ²	0.9998

Para el análisis, se calculó la densidad de BCMA por célula usando la siguiente fórmula:

$$BCMA \text{ density} = 10^{[(\log)(FITC \text{ BCMA}) \cdot a + b]} - 10^{[(\log)(FITC \text{ isotype}) \cdot a + b]}$$

Resultados

El cálculo de la densidad de BCMA por célula en el panel de líneas celulares de MM reveló que la línea celular EJM tenía el nivel más alto de densidad de BCMA y la línea celular MM1S tenía el nivel más bajo de densidad de BCMA en la superficie celular en relación con otras líneas celulares de MM usadas en el panel. La **figura 2** muestra la clasificación de las líneas celulares de MM en orden descendente de densidad de BCMA por célula. Basándose en estos resultados, se seleccionaron líneas celulares para su uso en estudios posteriores que interrogan las afinidades de unión de NKp46-BCMA_Fc a BCMA y la actividad lítica celular en células de MM. En particular, RPMI 8226 tiene una densidad de BCMA de aproximadamente 2000 sitios/célula, que está cerca del promedio en células de mieloma múltiple. MM1S tiene una densidad de BCMA de aproximadamente 800 sitios/célula, que corresponde casi al nivel de expresión de BCMA en células plasmáticas sanas. MM1R tiene una densidad de BCMA de aproximadamente 5500 sitios/célula, útil para determinar la eficiencia de las proteínas de unión de la divulgación a altos niveles de expresión.

Ejemplo 3: Caracterización de unión de variantes del formato Fc de NKp46-BCMA

Introducción

El NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE se valoró en células RPMI para determinar el valor de K_D para la unión a células tumorales de MM, así como linfocitos NK donantes. Posteriormente, se ensayaron distintas variantes del formato Fc de NKp46-BCMA-NKCE mediante SPR para confirmar la afinidad por FcRn, así como dos variantes del receptor CD16a.

Materiales y métodos

Células

Se adquirieron líneas celulares de mieloma múltiple RPMI 8226 en la ATCC. Las células se cultivaron en medio RPMI completo (RPMI-1640 que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales 1x).

Ensayo de valoración

Los linfocitos NK en reposo y las células RPMI 8226 ($1 \cdot 10^5$ células/pocillo) se tiñeron durante 1 hora en una placa de 96 pocillos con fondo en U con un intervalo de dilución en serie de 1/10 de moléculas no conjugadas a partir de 225 y 500 µg/ml, respectivamente. La tinción con anticuerpo secundario se realizó con anti IgG humana de cabra, PE específico del fragmento Fcγ (Jackson ImmunoResearch 109-116-170). Después de la tinción, las células se suspendieron de nuevo en BD Cellfix y se analizaron mediante citometría de flujo. Los parámetros se registraron y se analizaron con el software FlowJo. Los valores de CE50 de tinción se calcularon con GraphPad Prism usando un modelo de regresión no lineal de logística de 4 parámetros.

Experimento de unión por SPR - CD16a

Para las mediciones de afinidad de unión con CD16a, se preparó un tampón HBS-EP+ (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo BR1006-69) mezclando 100 ml de tampón HBS-EP+ 10x con 900 ml de agua purificada.

La captura de afinidad de las proteínas CD16a humanas se logró usando el kit de captura de His (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo 28995056). El anticuerpo de captura anti His se diluyó 1:20 en un tampón de análisis y se acopló al chip CM5 (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo 29149603) usando un acoplamiento de amina estándar para producir aproximadamente 8000 unidades de respuesta (UR) usando el kit de acoplamiento de amina (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo BR-100-50).

Se prepararon diez diluciones en serie 1:1 del anticuerpo biespecífico en tampón de ensayo HBS-EP+ a concentraciones de 5.8 nmol/l, 11.7 nmol/l, 23.4 nmol/l, 46.8 nmol/l, 93.75 nmol/l, 187.5 nmol/l, 375 nmol/l, 750 nmol/l, 1500 nmol/l y 3000 nmol/l. Las proteínas CD16a (V/F) se diluyeron con tampón HBS-EP+ a una concentración de 0.1 ng/ml y se usaron a esta concentración en los experimentos. CD16a (V176) y CD16a (V176F) se capturaron a un caudal de 10 µl/min durante 30 s en las celdas de flujo 2 y 4, respectivamente, para obtener valores de respuesta máxima ($R_{\text{máx}}$) de aproximadamente 30 UR.

Las mediciones se realizaron en experimentos cinéticos de ciclos múltiples. En cada experimento de ciclos múltiples, CD16a se capturó a través de un anticuerpo anti His inmovilizado en un chip sensor CM5 de la serie S (kit de captura de anticuerpos humanos, Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo BR1008-39). El anticuerpo biespecífico diluido en tampón HBS-EP+ se inyectó en una serie de diluciones 1:1 de 5.8 nmol/l a 3000 nmol/l durante 120 s a un caudal de 30 µl/min seguido de una fase de disociación de 120 s. Todas las concentraciones de analito se analizaron por duplicado junto con múltiples tampones en blanco para una doble referencia. La regeneración de la superficie de captura se realizó con dos inyecciones consecutivas de solución de regeneración (10 mmol/l de glicina a pH 1.5) durante 30 s a razón de 30 µl/min. Las afinidades de unión (valores de KD) del anticuerpo biespecífico contra CD16a humano

se evaluaron con el software de evaluación Biacore T200, versión 3.0 (Cytiva, Uppsala), usando un ajuste en estado estable de la respuesta de SPR para las concentraciones de anticuerpo medidas.

Experimento de unión por SPR - huNKp46 y BCMA

5 Para las mediciones de afinidad de unión con huNKp46 y BCMA, se prepararon diluciones en serie dobles de NKp46 humano (intervalo de concentración de 50 nM a 0.1 nM), NKp46 cyno (intervalo de concentración de 50 nM a 0.1 nM), BCMA humano (intervalo de concentración de 50 nM a 0.1 nM) y BCMA cyno (PPB-17990; intervalo de concentración de 50 nM a 0.1 nM) en tampón de ensayo HBS-EP+.

10 La captura por afinidad de las muestras de mAb (FF-20-1319-1, FF-20-1320-1, FF-20-1634-1, FF-20-1635-1, EFF-20-106-1, EFF-20-107-1) se logró usando el kit de captura de anticuerpos humanos (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo BR1008-39) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de captura anti Fc se diluyó 1:20 en un tampón de análisis y se acopló al chip CM5 (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo 29149603) usando un acoplamiento de amina estándar para producir aproximadamente 8000 unidades de respuesta (UR) usando el kit de acoplamiento de amina (Cytiva, Uppsala, n.º de catálogo BR-100-50).

15 Los anticuerpos (se diluyeron con tampón HBS-EP+ a una concentración de 0.1 a 0.4 µg/ml y se usaron a esta concentración en los experimentos. Los anticuerpos se capturaron a un caudal de 10 µl/min durante 120 s para producir valores de respuesta máxima (R_{máx}) de aproximadamente 30 UR.

20 Las mediciones se realizaron en experimentos cinéticos de múltiples ciclos para cada anticuerpo usando un instrumento Biacore 8K. En cada experimento de ciclos múltiples, los anticuerpos se capturaron a través de un anticuerpo anti Fc hum a inmovilizado en un chip sensor CM5 de la serie S (kit de captura de anticuerpos humanos, Cytiva, Uppsala, catálogo n.º BR1008-39).

Los antígenos, diluidos como se ha descrito anteriormente (intervalo de concentración de 0.1 nM a 50 nM), se inyectaron a un caudal de 60 µl/min durante 240 s seguido de una fase de disociación de 400 s. Todas las concentraciones de analito se analizaron por duplicado junto con múltiples espacios en blanco de tampón para doble referencia. La regeneración de la superficie de captura se realizó con solución de regeneración (3 mol/l de MgCl₂) durante 60 s a razón de 30 µl/min. Los datos de cinética de unión se evaluaron con el software de evaluación Biacore 8K, versión 1.1.1.7442, usando un modelo de unión 1:1 con limitación de transporte de masa.

Resultados

La valoración de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en células RPMI y linfocitos NK donantes demostró que NKp46-BCMA en un formato Fc que mejoraba la ADCC aún conservaba la afinidad por las dianas NKp46 y BCMA como se muestra en la **figura 3A** y la **figura 3B**.

El análisis de unión por SPR en un panel más grande de 12 formatos Fc distintos de NKp46-BCMA-NKCE confirmó la afinidad por CD16a y FcRn como se muestra en la **figura 4** y la **figura 5**, respectivamente. Cabe destacar que todas las moléculas mejoradas con ADCC demostraron una mayor unión a las variantes CD16 (V176) y (F176), como se muestra en la **figura 4**.

También se calculó la cinética de unión a NKp46 (ser humano y macaco cangrejero), BCMA (ser humano y macaco cangrejero) y FcγR para el NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE, y los resultados se muestran en las Tablas 4, 5 y 6 a continuación.

Tabla 4. Afinidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y NKCE de control por FcγR humanos y de macaco cangrejero: Valores de KD (nM)

FcγR		NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB					HUX1-IC-3H4
		KD (nM)			(nM)		KD media (nM)
	Modelo de ajuste	Exp. N.º 1	Exp. N.º 2	Exp. N.º 3	KD media	DE	S239D/I332E
HuFcγRI	Unión 1:1	0.32	0.27	0.38	0.32	0.06	0.06
HuFcγRIIa	Afinidad en estado estable	415	656	963	678	275	833
HuFcγRIIb	Afinidad en estado estable	1348	1062	1415	1275	187	916
HuFcγRIIIa F	Reacción de dos estados	18.0	20.4	29.7	22.7	6.2	93.3
HuFcγRIIIa V	Reacción de dos estados	11.7	12.1	16.5	13.4	2.7	18.3
HuFcγRIIIb	Afinidad en estado estable	1259	1692	2327	1759	537	1639
CyFcγRI	Unión 1:1	30.0	24.9	29.0	28.0	2.7	25.7
CyFcγRIIa	Afinidad en estado estable	1346	1440	1699	1495	183	1489
CyFcγRIIb	Afinidad en estado estable	884	1066	1295	1082	206	748
CyFcγRIII	Reacción de dos estados	10.0	9.3	15.7	11.7	3.5	15.7

Tabla 5. Afinidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB por NKp46 humano y de macaco cangrejero: Valores de ka, kd y KD (nM)

	Experimento N.º 1			Experimento N.º 2			Experimento N.º 3			Media	DE
	KD (nM)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (nM)	
Ser humano	11.8	1.6 ^E +05	1.9 ^E -03	13.2	1.4 ^E +05	1.8 ^E -03	12.5	1.4 ^E +05	1.8 ^E -03	12.5	0.7

Cyno	16.6	2.1E+05	3.0E-03	16.2	2.1E+05	3.4E-03	17.8	1.9E+05	3.3E-03	16.9	0.8

Tabla 6. Afinidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB por BCMA humano y de macaco cangrejero:

5 **Valores de k_a , k_d y KD (nM)**

		Experimento N.º 1			Experimento N.º 2			Experimento N.º 3			Media	DE
		KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	
10	Ser humano	0.2	2.8E+05	6.1E-05	0.2	3.2E+05	6.9E-05	0.3	1.9E+05	5.7E-05	0.2	0.1
		Experimento N.º 1			Experimento N.º 2			Experimento N.º 3			Media	DE
		KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD (nM)	
15	Cyno	0.4	1.7E+05	7.2E-05	0.3	1.8E+05	5.8E-05	0.3	1.8E+05	6.0E-05	0.3	0.1

Ejemplo 4: Los NKp46-BCMA NKCE genomanipulados en Fc demuestran una actividad citotóxica celular *in vitro* mejorada

Introducción

20 Los NKp46-BCMA NKCE genomanipulados en diferentes formatos Fc, ya sea con ADCC mejorada (Fc-DE, Fc-DE-DSB, Fc-ADE y Fc-ADE-DSB) o con ADCC no mejorada (NKp46-BCMA_Fc) se evaluaron para determinar su capacidad para promover la lisis de células tumorales de MM en presencia de linfocitos NK donantes, así como para evaluar la posible toxicidad de los linfocitos NK inespecíficos. Además, se compararon los NKp46-BCMA NKCE con controles de anticuerpos anti BCMA para evaluar su potencial para destruir tumores de MM.

Materiales y métodos

Células

Linfocitos NK humanos. Las capas leucocitarias humanas sanas se proporcionaron por el Etablissement Français du Sang (EFS, el servicio hematológico francés, Marsella; AC-2019-3428). Las células mononucleares periféricas (PBMC) se aislaron de las capas leucocitarias mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Los linfocitos NK humanos se purificaron a partir de PBMC con un kit de selección negativa basado en microesferas de STEMCELL Technologies o Miltenyi Biotec.

Líneas celulares de MM. Las líneas celulares de mieloma múltiple RPMI 8226 y MM1.S se adquirieron en la ATCC. Las células se cultivaron en medio RPMI completo (RPMI-1640 que contenía FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y aminoácidos no esenciales 1x).

Ensayo de citotoxicidad a base de linfocitos NK

Para los ensayos citotóxicos realizados en líneas celulares de MM, las células diana se cargaron alternativamente con Cr-51. Se realizaron intervalos de dilución en serie de 1/10 para los elementos de

prueba y control, partiendo de 5, 10 o 15 µg/ml según el experimento. Las moléculas ensayadas, las células diana marcadas (~3,000 células) y los linfocitos NK humanos (~30,000 células) de donantes sanos (recientes o en reposo durante una noche) se añadieron sucesivamente a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo redondo para obtener una relación 10:1 (E:D). Después de 4 h de incubación conjunta, el sobrenadante se transfirió a una Lumaplate (para Cr-51). En el ensayo de citotoxicidad basado en Cr-51, el Cr-51 liberado de las células diana muertas se determinó con un TopCount NXT™ (contador de centelleo y luminiscencia de microplacas; Perkin Elmer). La radiactividad se midió contando la emisión y durante 60 s para cada pocillo. Los resultados se expresan en cpm = recuentos por minuto. El porcentaje de lisis específica se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Lisis específica (\%)} = (ER \text{ (cpm)} - SR \text{ (cpm)}) / (MR \text{ (cpm)} - SR \text{ (cpm)}) \times 100$$

donde ER = liberación experimental, SR = liberación espontánea y MR = liberación máxima.

La CE₅₀ se determinó para cada molécula dibujando una curva de regresión no lineal apropiada (elección del modelo "log(agonista) frente a respuesta - pendiente variable (cuatro parámetros)") con el software Graphpad Prism.

Resultados

Los NKp46-BCMA NKCE genomanipulados en los formatos Fc que mejoraron la ADCC mejorada (Fc-DE, Fc-DE-DSB, Fc-ADE y Fc-ADE-DSB) promovieron la actividad citotóxica de las células tumorales de MM mediada por linfocitos NK de manera más eficaz que el formato de ADCC no mejorada, NKp46-BCMA_Fc, como se muestra en la **figura 6**. La actividad citotóxica no se vio afectada por la introducción de los DSB, que estabilizan la molécula. Tanto NKp46-IC_Fc-ADE como NKp46-BCMA_Fc mediaron la muerte de células tumorales de MM en presencia de efectores de linfocitos NK a un nivel similar o con una actividad citotóxica superior con respecto a un anticuerpo anti BCMA en formato IgG1 (BCMA_IgG1) o un anticuerpo anti BCMA en un formato IgG1 afucosilado (Referencia 1) como se muestra en la **figura 7** y la **figura 8**.

Aunque tanto NKp46-IC_Fc-ADE como NKp46-BCMA_Fc tenían una actividad citotóxica superior en células tumorales de MM en presencia de linfocitos NK, no se observó una destrucción fratricida de linfocitos NK, lo que indica que los NKp46-BCMA NKCE no inducen posibles efectos tóxicos inespecíficos (**figura 9**).

Se ha descrito la presencia de BCMA soluble en el suero de pacientes con MM. Hipp *et al.* (2017) Leukemia 31: 1743-1751. El BCMA soluble valorado a concentraciones crecientes en ensayos citotóxicos con células de MM y cocultivos de linfocitos NK demuestran que el BCMA soluble influyó ligeramente en la potencia del NKp46-BCMA NKCE, pero no en el nivel máximo de lisis de células de MM, como se muestra en la **figura 10**.

Ejemplo 5: Ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando la liberación de calceína como indicador

Materiales y métodos

Muestras de sangre completa: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas frescas a partir de muestras de sangre completa de donantes sanos suministradas por EFS lle

de France siguiendo los "términos y condiciones" descritos en el acuerdo N.º 12/EFS/131 establecido entre EFS Ile de France y Sanofi-Aventis Recherche et Développement.

Aislamiento de PBMC humanas a partir de sangre completa: Las PBMC humanas se aislaron de sangre completa de donantes sanos (HD, por sus siglas en inglés) mediante una centrifugación en gradiente de densidad.

La sangre completa se recuperó de la bolsa de sangre y se diluyó con 40 ml de solución tampón de fosfato (PBS) estéril. Se dispensaron quince ml de Ficoll-Paque Plus Cytiva (Sigma Aldrich, ref. n.º 17-1440-02) en el centro de cuatro tubos sepMate-50 (Stemcell ref. n.º 85450). A continuación, se añadieron suavemente 80 ml de la sangre diluida en el borde de cada tubo sepMate-50 que contenía solución de Ficoll (20 ml por tubo). Los tubos se centrifugaron a razón de 1200 g durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA) sin frenado. Se recuperaron las cuatro capas de capa leucocitaria y se recogieron en dos tubos de 50 ml. La solución de leucocitos se completó con PBS estéril hasta un volumen final de 50 ml. Los dos tubos se centrifugaron dos veces (entre cada centrifugación, el sobrenadante se descartó y se añadieron 50 ml de PBS) a razón de 400 g durante 10 minutos a TA con frenado. Después de la última centrifugación, los sedimentos se mezclaron y el volumen se completó a 10 ml con medio RPMI1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y L-glutamina 2 mM (medio de cultivo completo). El número total de PBMC viables se definió mediante recuento Vicell XR (instrumento de recuento celular Beckman Coulter).

Recogida de linfocitos NK: Los linfocitos NK humanos se purificaron a partir de PBMC usando el kit de aislamiento de linfocitos NK de sangre completa MACSxpress® (Miltenyi) de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. A continuación, los linfocitos NK se cultivaron en medio completo a razón de 5×10^6 células/ml a +37 °C con CO₂ al 5 % (los denominados linfocitos NK "en reposo") durante una noche antes de usarlos en el ensayo de activación. Se reservaron 1×10^6 células para evaluar su expresión de NKp46 y CD16 mediante citometría de flujo.

Línea celular: Las células RPMI8226 (ATCC CCL-155), MM.1R (ATCC CRL-2975) y MM.1S (ATCC CRL-2974) son una línea celular de mieloma múltiple (plasmocitoma). Crecen principalmente en suspensión, mientras que algunas células pueden crecer adherentes (ocasionalmente hasta el 50 %). Para el mantenimiento, las células se suspendieron de nuevo en medio completo fresco a razón de 0.3×10^6 células/ml durante 3 o 4 días.

Soluciones madre: La solución madre de cada anticuerpo se almacenó en PBS a 4 °C. El día del ensayo, los productos se agitaron vorticialmente para eliminar los posibles agregados antes de la dilución en cascada. Se realizó un intervalo de dilución de 200 nM (dos veces concentrado) a 0.02 pM (dilución en serie 1/10) en medio de cultivo completo.

De estas diluciones en serie se añadieron 100 µl a cada pocillo que contendrá la suspensión de células (50 µl de células diana BCMA+RPMI8226 y 50 µl de NK) para obtener una concentración final de 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 nM.

Para las condiciones de anticuerpos combinados (sin unión a NKp46 o CD16), la primera concentración se concentró 4 veces y 50 µl de NKp46-BCMA-Fc ADE-DSB para alcanzar la misma concentración de los otros anticuerpos ensayados.

Ensayo citotóxico: Las células diana BCMA+RPMI8226 (o MM.1R, o MM.1S) se contaron el día del ensayo y se evaluó la cantidad de células necesarias para el experimento (5000 células/pocillo). Las células diana a una concentración de $1 \times 10^6/\text{ml}$ se suspendieron de nuevo en 4 ml de medio completo que contenía 10 µl de calceína-AM (50 µg) previamente reconstituida en 25 µl de DMSO. Las células marcadas se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % (dióxido de carbono) durante 30 minutos.

Se prepararon diluciones en serie de anticuerpos y se añadieron a una placa de 96 pocillos con fondo en U (100 µl/pocillo) (placa de 96 pocillos múltiples de fijación ultrabaja Corning® Costar®; Thermo Scientific).

Las células diana se lavaron 3 veces con 5 ml de medio completo (cada lavado vino seguido de una centrifugación de 300 g durante 5 minutos y descarte del sobrenadante). El lavado final se realizó en un medio completo que contenía Probenecid (concentrado 4 veces) (ThermoFisher Scientific). Las células diana se contaron y se sembraron a razón de 5000 células/50 µl por pocillo. Finalmente, se añadieron linfocitos NK en una relación de E/D de 10:1 a las suspensiones de células diana y anticuerpos. Como controles, se añadieron células diana solas y células diana con NK, pero sin anticuerpos. Además, para alcanzar la muerte máxima de células diana, se consideró un 2 % de Triton X. Cada condición se realizó por duplicado. Las placas de cultivo se incubaron a 37 °C en presencia de CO₂ al 5 % durante 4 horas al final de las cuales se recogieron 100 µl de sobrenadante, se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos de color negro de fondo plano de unión media, para evaluar la liberación de calceína de las células diana muertas en la máquina TECAN 1000Pro.

Análisis de datos: Para convertir la concentración de anticuerpos de mg/ml a M se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mg/ml)}/\text{Peso molecular (Da)} = \text{Concentración molar (M)}$$

Para el análisis de destrucción, el porcentaje de lisis específica se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = [(ER - SR) \times 100 / (MR - SR)]$$

ER = liberación experimental (célula diana + NK + [Anticuerpo])

SR = liberación espontánea (célula diana sola)

MR = liberación máxima (células diana + Triton X al 2 %)

Análisis estadístico: Los análisis se realizaron con GraphPad Prism 9.1.2. Los valores más altos de lisis correspondieron a la lisis máxima observada (media de valores duplicados). Los valores de concentración eficaz máxima media (CE₅₀) se expresaron en pM y se calcularon usando un modelo de regresión no lineal de logística de 4 parámetros, de acuerdo con Ratkowsky y Reedy.

Resultados

La activación de los linfocitos NK se determinó midiendo el % de lisis específica de las células RPMI 8226 por los linfocitos NK y uno de los siguientes: NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB, que activa tanto

NKp46 como CD16a; un NKp46-BCMA-Fc incompetente-DSB (una molécula que se une solo a NKp46); X-BCMA-ADE-DSB (una molécula que se une solo a CD16a); una combinación del anticuerpos de unión solo a NKp46 y de unión solo a CD16a o de control de isotipo (X-BCMA-Fc incompetente-DSB que se une solo a BCMA en las células tumorales y no en los linfocitos NK, y el NKp46-X-ADE-DSB que se une a NKp46 y CD16a en los linfocitos NK pero no en las células tumorales). La activación óptima de linfocitos NK se produjo con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en comparación con los otros cuatro anticuerpos y la combinación de agentes de direccionamiento único, lo que indica que: (1) el direccionamiento doble de NKp46 y CD16a da como resultado una mayor potencia y eficacia en la destrucción de células tumorales que el acoplamiento único y (2) la importancia de tener el brazo NKp46 y el brazo CD16a en la misma molécula para una potencia optimizada (**figura 11**).

Además, se encontró que la alta potencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB permitió una fuerte eficiencia en la destrucción de células tumorales incluso en modelos de células de MM que expresan niveles bajos de BCMA (por ejemplo, células MM1S) (**figura 12**).

NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB también se comparó con un anticuerpo monoclonal anti BCMA que tenía características de ADCC mejorada (por ejemplo, anticuerpo anti BCMA afucosilado). NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB demostró una lisis máxima comparable y una mejor potencia en comparación con el anticuerpo anti BCMA afucosilado tanto en células RPMI 8226 como en células MM1S (**figura 13**).

Ejemplo 6: Los NKp46-BCMA NKCE genomanipulados en Fc demuestran una actividad antitumoral *in vivo* potente y específica

Introducción

Para evaluar la eficacia *in vivo* de NKp46-BCMA NKCE contra las células tumorales, se estableció un modelo de xenoinjerto de ratón que no expresaba CD16. La **figura 14A** es un esquema del conjunto experimental para determinar la actividad antitumoral *in vivo* de NKp46-BCMA_Fc en el modelo de xenoinjerto de ratón. Brevemente, se inyectó por vía intravenosa (i.v.) una mezcla 1:1 de células RMA de linfoma de ratón fluorescentes verdes (eGFP) y rojas (dsRed) que no expresaban y que expresaban, respectivamente, BCMA humano en ratones deficientes en Rag1 transgénicos para NKp46 humano (Tg huNKp46 Rag1 -/-). Los ratones portadores de tumores (n = 7 para cada grupo) se trataron una vez con una dosis total de 12.2 picomoles de NKp46-BCMA_Fc o vehículo como control. Se realizó una biopsia del hígado de los ratones 48 h después del tratamiento y se monitorizó el recuento absoluto de células RMA infiltradas mediante citometría de flujo. Se realizó una biopsia del hígado de los ratones 48 horas después del tratamiento y se monitorizó el recuento absoluto de células RMA infiltradas mediante citometría de flujo como se describe a continuación y se muestra las **figura 14B-figura 14E** correspondientes.

Materiales y métodos

Actividad antitumoral *in vivo* en un modelo a corto plazo

La actividad de la molécula BCMA-NKCE se evaluó en un modelo de tumor diseminado usando células de leucemia RMA de ratón, RMA transducidas-dsRed-huBCMA Cl.E6 (BCMA positivas) o no RMA-eGFP Cl.5A6 (BCMA negativas) para determinar la expresión de BCMA humano y se mezclaron en una relación 1:1 para inyección en la vena de la cola el día 0 de ratones inmunodeficientes que expresaban

NKp46 humano en linfocitos NK (HuNKp46 Tg Rag1-/-) (N = 14). Los ratones se dividieron en dos grupos, tratados el día 0 con el vehículo (N = 7) o con la molécula NKp46-BCMA_Fc (N = 7) a una dosis fija de 12.3 picomoles por ratón.

Los ratones fueron sacrificados el día 2 (48 h después del tratamiento) y se diseminaron las células RMA extraídas del hígado mediante trituración con OctoMacs® y aislamiento en gradiente de Percoll. Las células RMA que se infiltraron en el hígado se analizaron y se contaron mediante citometría de flujo.

Cuantificación y análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico secuencial de los datos obtenidos usando GraphPad Prism V7. Se aplicó una transformación logarítmica a los datos de relación obtenidos para realizar el análisis estadístico. Se realizó una prueba de normalidad (d'Agostino-Pearson) para confirmar el uso de una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis seguida de una prueba posterior de comparación). Cada grupo tratado se comparó sistemáticamente con el grupo de vehículo de control. Si los datos no se distribuyeron normalmente, la significación estadística de las diferencias entre las poblaciones de muestras emparejadas se determinó con la prueba de rangos con signo de pares emparejados de Wilcoxon. *N* es el número de muestras usadas en los experimentos. Se muestran las medias o medianas, con o sin barras de error que indican la DE. La significación se indica de la siguiente manera: **p* ≤ 0.05; ***p* ≤ 0.01; ****p* ≤ 0.001, *****p* ≤ 0.0001. Se usó un análisis de regresión no lineal de cuatro parámetros para calcular la CE₅₀ de NKp46-BCMA_Fc NKCE.

Resultados

Antes del injerto, había relativamente 1.5 veces más células RMA dsRed-huBCMA que células eGFP-huBCMA-negativas, según se analizó por citometría de flujo, y solo las células RMA dsRed expresaron BCMA (**figura 14B-14C**). También se pudo detectar la expresión de BCMA humano en células RMA dsRed antes del injerto (*in vitro*) y después del injerto en biopsias de hígado (*ex vivo*), según se analizó por citometría de flujo (**figura 14D**). Después de 48 horas de tratamiento con NKp46-BCMA-FC o control de vehículo, el recuento absoluto de células RMA infiltradas en el hígado (izquierda) y la relación de células dsRed/eGFP (derecha) analizados por citometría de flujo demostraron que la destrucción de tumores con NKp46-BCMA_Fc era específica para las células tumorales que expresaban BCMA (**figura 14E**).

Ejemplo 7: NKp46-BCMA Fc-ADE-DSB promueve la activación de linfocitos NK autólogos y la destrucción de células de mieloma múltiple (MM) ex vivo

Introducción

Se obtuvieron muestras de médula ósea y sangre periférica que contenían células de mieloma múltiple y células efectoras inmunitarias autólogas de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple recién diagnosticado o recidivante no tratados o tratados con tratamientos de referencia para evaluar el impacto acumulativo de un NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE *ex vivo*.

Material y métodos

Células y tinción

Se obtuvieron muestras de médula ósea y sangre periférica de la cohorte MYRACLE (Benaniba *et al.*, BMC Cancer, 2019). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y las células mononucleares de médula ósea (BMMC) se aislaron mediante centrifugación de densidad en gradiente usando Ficoll-Hypaque. La muestra del paciente que se sometió al tratamiento de referencia había sido tratada previamente con daratumumab, carfilzomib, dexametasona y revlimid.

Las células (4×10^5 células/pocillo) se incubaron en RPMI que contenía FCS al 5 % y 3 ng/ml de IL-6, en presencia de CTL-NKCE2, NKCE2 (10 ug/ml), Referencia 4 (20 ug/ml) u obinutuzumab (10 ug/ml) durante 24 horas. Al final de la incubación, las células se transfirieron a placas con fondo en V y las placas se centrifugaron durante 1 min a 3000 rpm y se lavaron una vez en PBS. Se añadió un panel de anticuerpos en tampón de tinción BD pharmingen BSA/tampón de tinción Brilliant en cada condición como se describe en la tabla a continuación.

Las células se suspendieron de nuevo en tampón FAC y se analizaron mediante citometría de flujo usando un FACS Symphony. La activación de los linfocitos NK, como se describe más adelante, se evaluó mediante la expresión de CD107a y CD69 en los linfocitos NK CD3-/CD56+ y la muerte de las células de mieloma se evaluó mediante la desaparición de las células CD138+/CD38+.

Tabla 7 - Anticuerpos usados para la activación de NK y la muerte de células de mieloma

Reactivo	Proveedor	Referencia	Comentarios
Anti CD56-BUV737 humano	BD Biosciences	612767	Clon NCAM16.2, dilución 1/200
Anti CD107a(LAMP-1)-APC humano	Biolegend	328620	Clon H4A3, dilución 1/100
Anti CD69-BV650 humano	Biolegend	310934	Clon FN50, dilución 1/100
Anti CD3-PB humano	BD Biosciences	625565	Clon SP34-2, dilución 1/100
Anti CD138-PerCP-eF710 humano	ThermoFisher	46-1388-41	Clon MI15, dilución 1/50
Anti CD38-FITC humano	Cytognos/Med Tech	CYT-38F2	policlonal, dilución 1/100

Ensayo de activación de linfocitos NK

Se añadieron las moléculas en placas de 96 pocillos con fondo en U. A continuación se añadieron sucesivamente 50,000 linfocitos NK en reposo y 50,000 células RPMI 8226 en cada pocillo para obtener una relación de efector con respecto a diana (E:D) de 1:1. Las condiciones de control se realizaron añadiendo solo 50,000 linfocitos NK en reposo por pocillo. Se añadió la solución BD GolgiSTOP™ (BD Biosciences, 554724) a una dilución final de 1/6000e en cada pocillo (control y experimental). Se realizó un control positivo de la activación de los linfocitos NK usando 125 ng/ml finales de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, SIGMA, P8139) y 1 µg/ml final de ionomicina (IONO, SIGMA, I0634) añadidos en 50,000 linfocitos NK en reposo por pocillo. Cada condición se realizó por duplicado. Después de 4 h de incubación

conjunta a 37 ± 1 °C y $5 \pm \text{CO}_2$ al 1 %, se realizó una tinción extracelular para determinar los marcadores CD3, CD56, CD69, CD107a y CD107b. Después de la fijación y permeabilización de las células, se realizó una tinción intracelular para la medición de la producción intracelular de IFN γ , TNF α y MIP1 β . Las mezclas de anticuerpos se centrifugaron a 16,000 g durante 10 min a +4 °C para eliminar los posibles agregados.

Las células se suspendieron de nuevo en tampón de tinción (PBS, BSA al 0.2 %, EDTA 2 mM, azida al 0.02 %) después de la última tinción y se analizaron mediante citometría de flujo (FC, por sus siglas en inglés).

Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo. El análisis del porcentaje de activación de linfocitos NK se realizó con GraphPad Prism. Los valores más altos de activación correspondieron a la activación máxima observada. Los valores de concentración eficaz máxima media (CE50) se calcularon usando un modelo de regresión no lineal de logística de 4 parámetros correspondiente a la siguiente ecuación:

$$NK \text{ cell activation (\%)} = \text{calculated bottom} + \frac{\text{calculated top} - \text{calculated bottom}}{1 + 10^{[(\log](EC50) - \log(\text{concentration}))^{slope}]}}$$

El valor inferior de activación calculado, el valor superior de activación calculado, la pendiente y el intervalo de confianza del 95 % (IC) se calcularon usando el mismo modelo que la CE50

Resultados

El análisis de citometría de flujo de las PBMC de pacientes con MM que se trataron con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE mostró una disminución en la frecuencia de células de mieloma marcada por la desaparición de células CD138+/CD38+ (**figura 15A**, panel izquierdo) y un aumento de los linfocitos NK activados, según lo evaluado por la expresión de CD107a y CD69 en los linfocitos NK CD3-/CD56+ (**figura 15A**, panel central y derecho) con respecto al anticuerpo DE anti BCMA IgG1 o los controles sin anticuerpo. Estas diferencias en los niveles de expresión de los marcadores se cuantificaron en los gráficos de barras correspondientes, como se muestra en la **figura 15B**. La **figura 16** representa la caracterización *ex vivo* de la actividad de destrucción tumoral de NKp46-BCMA_Fc-ADE-NKCE en un entorno autólogo con aspirados de médula ósea de pacientes con MM, ya sea en el momento del diagnóstico o en los que no han respondido a diversas terapias (TC; clase terapéutica), incluidos los tratamientos de referencia (SoC) (daratumumab, isatuximab, inhibidores del proteasoma, IMiD, dexametasona, agente alquilante, mimético de BH3, inhibidor de histona desacetilasa), anti CD47, activadores de linfocitos T CD3-CD38 o CD3-BCMA. Las muestras que demostraron una lisis ≤ 10 % se asociaron a una relación de E:D muy baja.

NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE muestra una actividad antimieloma *ex vivo* similar (entorno autólogo) en muestras de pacientes en el momento del diagnóstico o en la recidiva. No se observa disminución de la actividad antimieloma en la recidiva.

Estos datos demuestran que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE activan linfocitos NK *ex vivo* en muestras primarias de pacientes con MM en un ensayo autólogo, por ejemplo, con células de mieloma múltiple y linfocitos NK del mismo paciente.

Ejemplo 8: Los NKp46-BCMA NKCE genomanipulados en Fc demuestran una actividad antitumoral *in vivo* potente y específica y una semivida de eliminación favorable

Introducción

5 Este ejemplo evalúa el perfil farmacocinético (PK) y los parámetros de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE después de una única administración intravenosa (2.5 mg/kg) a ratones transgénicos huFcRn Tg32 hembra.

Material y métodos

Estudios PK en ratones transgénicos hFcRn

10 Los experimentos con ratones se realizaron en ratones transgénicos Tg32 (B6.Cg-Fcgrttm,1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ) procedentes de ratones C57BL/6 y adquiridos en The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Los ratones Tg FcRn-/- hFcRn (línea 32) tienen una mutación nula para el gen de ratón y un transgén que expresa el transgén de la cadena α hFcRn bajo el control de su promotor humano natural. Al inicio del estudio se usaron tres ratones hembra adultos homocigotos no tratados Tg32 (peso corporal medio de 21.4 g).

15 Para la pauta posológica, se preparó NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE (solución madre: 1.5 mg/ml) en His 10 mM, NaCl 150 mM, tampón a pH 6 diluido en el mismo tampón de forma extemporánea y administrado como dosis intravenosas únicas de 2.5 mg/kg en la vena de la cola con un volumen de dosis de 10 ml/kg. Los animales se evaluaron usando un enfoque de muestreo en serie 0.083, 4, 24, 72, 168, 336, 504 y 672 horas después de la dosificación durante la duración del estudio de 28 días.
20 En cada punto temporal, se extrajeron muestras de sangre (~20 μ l - muestreo en serie) de la vena safena en dispositivos de extracción de K3-EDTA. Inmediatamente después de la extracción, las muestras de sangre se colocaron en hielo húmedo y a continuación se centrifugaron. A continuación, se diluyeron 4 μ l de plasma en 60 μ l de DPBS (solución salina tamponada con fosfato).

El método analítico fue el siguiente:

___ La concentración en cada punto temporal se determinó mediante un ensayo LC-MS/MS de abajo hacia arriba usando el siguiente método genérico: Después de la precipitación de una alícuota de plasma, el sedimento de plasma se sometió a desnaturalización de proteínas, reducción, alquilación, digestión con tripsina y extracción en fase sólida antes del análisis del péptido sustituto. El péptido sustituto VYACEVTHQGLSSPVTK, perteneciente a las regiones Fab (cadena ligera), se seleccionó para cada anticuerpo para su cuantificación, dependiendo de su selectividad y factor de respuesta. Los patrones de calibración se prepararon añadiendo el anticuerpo al plasma a razón de 1, 2.8, 7, 14, 40, 80 y 100 μ g/ml. La separación de péptidos se realizó en un sistema UHPLC Shimadzu con una columna Xbridge BEH C18 de fase inversa (2.1 x 150 mm, 3.5 μ M, 300 Å, Waters) a un caudal de 600 μ l/min en un gradiente escalonado de ácido fórmico al 0.1 % en agua y ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo. Para la detección, se usó un espectrómetro de masas Sciex API6600 TripleTOF en modo de ion producto positivo, con la temperatura de la fuente a 500 °C, el voltaje de ionización por electronebulización a 5500 V, el gas de cortina a 35 y los gases del nebulizador a 50. El tiempo de permanencia fue de 15 ms para cada experimento. El potencial de desagrupamiento fue de 90 V y la energía de colisión fue de 26 V. El fragmento

de 807.4098 m/z del ion original de 626.0 m/z del péptido sustituto único de los anticuerpos se usó para la determinación de la concentración relativa a los patrones y controles, usando el área de pico del algoritmo de integración MQ4 del software MultiQuant.

Método de ensayo

- 5 Las concentraciones de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE se determinaron en plasma usando un método LBA exploratorio. Se capturó NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE por el antígeno de biotina-BCMA unido a las perlas de estreptavidina de los discos microestructurados Gyrolab y se detectó usando el trazador Alexa-tag de anti IgGFcg humano de cabra. El valor del límite inferior de cuantificación (LLOQ, por sus siglas en inglés) fue de 1.00 µg/ml.

10 Análisis estadístico

Los valores de concentración plasmática individual de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE (expresados en µg/ml) se resumieron mediante estadísticas descriptivas (media, desviación estándar [DE] y coeficiente de variación [% de CV]) y se representaron en tablas por tiempo de muestreo. Todos los resultados se informaron con tres cifras significativas, excepto el % de CV sin decimales.

- 15 Los parámetros PK individuales se resumieron mediante estadísticas descriptivas como se ha descrito anteriormente. Los valores individuales y medios se expresaron con tres cifras significativas (excepto tmáx y túltimo redondeados adecuadamente al valor del tiempo, con solo la mediana y los valores del intervalo [mín-máx] informados).

Resultados

- 20 No se observaron signos ni síntomas clínicos durante el estudio.

Los valores medios e individuales (N = 3) de las concentraciones plasmáticas de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE (ug/ml) obtenidas después de una única administración IV (2.5 mg/kg) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE a ratones hembra huFcRn tg32 se indican a continuación en la **Tabla 8** y las concentraciones plasmáticas medias e individuales correspondientes frente a los perfiles de tiempo se muestran en la **figura 18** y la **figura 19**, respectivamente.

Tabla 8 - Concentraciones de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE en plasma después de la administración de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE a ratones huFcRn tg32

			Tiempo							
			(día)							
			0.0035	0.17	1	3	7	14	21	28
Vía	Dosis (mg/kg)	Id. del animal	Concentraciones (ug/ml)							
i.v.	2,5	1	61.0	36.2	17.9	15.6	13.8	9.71	7.37	4.54
		2	56.9	26.4	14.3	15.1	13.9	8.21	5.56	4.55
		3	56.9	35.2	20.7	22.3	13.3	8.71	7.98	4.60
		Media	58.3	32.6	17.6	17.7	13.7	8.88	6.97	4.56
		DE	2.37	5.39	3.21	4.02	0.321	0.764	1.26	0.0321
		% de CV	4	17	18	23	2	9	18	1

Los valores medios e individuales (N = 3) de los parámetros farmacocinéticos de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE en plasma después de una única administración intravenosa (2.5 mg/kg) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE se presentan a continuación en la **Tabla 9**.

Tabla 9 - Parámetros PK de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE en plasma después de la administración de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE a ratones huFcRn tg32

Id. del animal	C ₀ (ug/ml)	AUC _{ultimo} (diaxug/ml)	t _{ultimo} (día)	AUC _{todos} (diaxug/ml)	AUC (diaxug/ml)	AUC _{Extrap} (%)	CL (ml/día/kg)	V _{ss} (ml/kg)	t _{1/2} (día)	λ _{2 inferior} (día)	λ _{2 superior} (día)
1	61.7	307	28	307	395	22.3	6.33	118	13.4	7	28
2	57.8	272	28	272	357	23.8	6.99	132	13.0	7	28
3	57.5	325	28	325	423	23.3	5.91	113	14.8	7	28
Media	59.0	301	28	301	392	NA	6.41	121	13.7	NA	NA
DE	2.33	26.6	[28-28]	26.6	32.9	NA	0.546	9.82	0.964	NA	NA
% de CV	4	9	-	9	8	NA	9	8	7	NA	NA

Tras la administración intravenosa de 2.5 mg/kg, las concentraciones de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE fueron cuantificables en plasma hasta 28 días (último tiempo de muestreo). El aclaramiento plasmático se estimó en 6.4 ± 0.546 ml/día/kg y el volumen de distribución en estado estable fue de 121 ± 9.82 ml/kg, lo que dio lugar a una semivida de eliminación terminal (t_{1/2}) de aproximadamente 14 días.

Ejemplo 9: NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 muestra una fuerte actividad antitumoral de una manera en respuesta a la dosis y demuestra una mejor actividad mediante la activación conjunta tanto de CD16 como de NKp46 en los linfocitos NK.

Introducción

La eficacia de NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 se evaluó en ratones huNKp46-Tg x Rag injertados con células EL4 murinas diseminadas que expresaban BCMA humano. El dominio Fc competente para IgG1 es capaz de unirse a todos los FcγR murinos activadores, para reclutar células efectoras murinas e inducir ADCC con linfocitos NK murinos.

Material y métodos

A los ratones se les inocularon por vía intravenosa 0.5×10^6 células tumorales el día 0. Los tratamientos se administraron IP el día 1 posterior a la implantación del tumor. Los siguientes anticuerpos de control se administraron a razón de 5 mg/kg: NKp46-CD16-X Fc WT que se une a huNKp46 t FcγR murinos pero no a huBCMA; NKp46-X-BCMA que se une a huNKp46 y BCMA pero con la mutación LALA Fc que inhibe la unión a FcγR murinos y el reclutamiento de células efectoras murinas a través de CD16; X-CD16-BCMA que se une a huBCMA y FcγR murinos pero no a huNKp46. NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 se administró a razón de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg. El grupo de control no recibió tratamiento.

Los ratones se controlaron diariamente y se anotaron las reacciones clínicas adversas. Los ratones se pesaron individualmente todos los días hasta el final del experimento (día 60). Los ratones fueron sacrificados cuando empezaron a estar moribundos de acuerdo con los criterios predefinidos para evitar el sufrimiento animal. Los signos clínicos relacionados con la patología, considerados críticos, son parálisis de los miembros, ascitis, masa tumoral interna palpable, morbilidad o pérdida de peso superior o igual al 20 %.

Los criterios de valoración de eficacia primarios fueron el tiempo de supervivencia medio (MST, por sus siglas en inglés) en días, el porcentaje de aumento de la esperanza de vida (% de ILS) y la tasa de supervivencia a largo plazo.

Se informaron los días individuales de muerte (si los hubo) de cada ratón. Se determinó el MST para cada grupo y se calculó la relación de ILS y se expresó como porcentaje:

$$\% \text{ de ILS} = 100 \times (T-C)/C$$

donde T = MST del grupo tratado y C = MST del grupo control.

Una dosis se considera terapéuticamente activa cuando el % de ILS es superior al 25 % y muy activa cuando el % de ILS es superior al 50 % (Johnson JI *et al.* (2001) Br J Cancer 84(10):1424-1431).

- 5 Relaciones entre la actividad farmacológica en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* del NCI y ensayos clínicos tempranos. *Id.*

La tasa de supervivencia a largo plazo se define como el número de ratones con una duración de supervivencia superior o igual a 2 veces el MST del grupo de control sobre el número total de ratones en el grupo expresado en porcentaje.

10 **Resultados**

Los resultados se presentan en la figura 20 y la Tabla 10.

- El NKp46-BCMA Fc WT NKCE indujo una actividad estadísticamente significativa a las dosis de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg en el modelo diseminado de EL4-huBCMA, con un ILS en comparación con el control del 215 % y el 57 % de los supervivientes a largo plazo para la dosis de 5, un ILS del 215 % y el 62.5 % de los supervivientes a largo plazo a la dosis de 0.5 y un ILS del 132 % y el 12.5 % de los supervivientes a largo plazo a la dosis de 0.25 mg/kg.

- El X-CD16-BCMA NKCE de control indujo una actividad estadísticamente significativa a la dosis de 5 mg/kg en el modelo diseminado de EL4-huBCMA, con un ILS del 147 % y el 28.6 % de supervivientes a largo plazo, mientras que el NKp46-X-BCMA NKCE de control no indujo una actividad significativa a la dosis de 5 mg/kg con un ILS del 84 % sin ningún superviviente a largo plazo.

En conclusión, el NKp46-BCMA CODV-OL1 NKCE mostró una actividad dependiente de la dosis con una fuerte actividad a partir de 0.05 mg/kg y la actividad con los controles de NKp46-X-BCMA y X-CD16-BCMA NKCE demostró el beneficio de la activación conjunta de los linfocitos NK tanto con NKp46 como con FcγR, lo que conduce a una eficacia *in vivo* mejorada.

Tabla 10: Actividad de NKp46-BCMA Fc WT CODV-OL1 y anticuerpos biespecíficos de control en ratones huNKp46-Tg x Rag portadores de células tumorales EL4-huBCMA diseminadas

Grupo	Supervivientes a largo plazo	Tiempo de supervivencia medio en días	Aumento de la esperanza de vida
NKp46-BCMA a razón de 5 mg/kg	57%	> 60	215%
NKp46-BCMA a razón de 0.5 mg/kg	62.5%	> 60	215%
NKp46-BCMA a razón de 0.05 mg/kg	12.5%	44	132%
X-CD16-BCMA a razón de 5 mg/kg	28.6%	47	147%

Grupo	Supervivientes a largo plazo	Tiempo de supervivencia medio en días	Aumento de la esperanza de vida
NKp46-X-BCMA a razón de 5 mg/kg	0%	35	84%
NKp46-CD16-X a razón de 5 mg/k	0%	19	-
Control	0%	19.5	-

Ejemplo 10: El NKCE mejorado con ADCC muestra una clara superioridad *in vivo* en comparación con el Fc WT NKCE.

Introducción

La eficacia del sustituto muNKp46-huBCMA Fc WT y Fc-ADE CODV-OL1 se evaluó en ratones huFcγR-Tg injertados con células EL4 murinas diseminadas que expresaban BCMA humano. Los ratones huFcγR-Tg se han generado por el Rockefeller Institute (Smith P *et al.* (2012) PNAS, 109(16):6181-6186), estos ratones expresan los 5 receptores Fc y humanos. La mutación ADE mejora la afinidad del receptor Fc por el receptor FcγRIIIA humano expresado por los linfocitos NK, pero no mejora la afinidad por el ortólogo de ratón FcγRIV. Los ratones huFcγR-Tg se usaron para evaluar la posible actividad mejorada del ADE frente al WT NKCE. El sustituto de control contiene un dominio Fc competente para IgG1.

Material y métodos

A los ratones se les inocularon por vía intravenosa 5×10^6 células tumorales el día 0. Los tratamientos se administraron IP el día 1 posterior a la implantación del tumor. Se administró un anticuerpo de control que se unía a muNKp46 pero no a huBCMA (muNKp46-X) a razón de 5 mg/kg. Se administraron muNKp46-BCMA Fc WT y Fc-ADE CODV-OL1 a razón de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg.

Los ratones se controlaron diariamente y se anotaron las reacciones clínicas adversas. Los ratones se pesaron individualmente todos los días hasta el final del experimento (día 60). Los ratones fueron sacrificados cuando empezaron a estar moribundos de acuerdo con los criterios predefinidos para evitar el sufrimiento animal. Los signos clínicos relacionados con la patología, considerados críticos, son parálisis de los miembros, ascitis, masa tumoral interna palpable, morbilidad o pérdida de peso superior o igual al 20 %.

Los criterios de valoración de eficacia primarios fueron el tiempo de supervivencia medio (MST) en días, el porcentaje de aumento de la esperanza de vida (% de ILS) y la tasa de supervivencia a largo plazo.

Se informaron los días individuales de muerte (si los hubo) de cada ratón. Se determinó el MST para cada grupo y se calculó la relación de ILS y se expresó como porcentaje:

$$\% \text{ de ILS} = 100 \times (T-C)/C$$

donde T = MST del grupo tratado y C = MST del grupo control.

Una dosis se considera terapéuticamente activa cuando el % de ILS es superior al 25 % y muy activa cuando el % de ILS es superior al 50 % (Johnson JI *et al.* (2001) Br. J. Cancer 84(10):1424-31).

La tasa de supervivencia a largo plazo se define como el número de ratones con una duración de supervivencia superior o igual a 2 veces el MST del grupo de control sobre el número total de ratones en el grupo expresado en porcentaje.

Resultados

5 Los resultados se presentan en la **figura 21** y la Tabla 11.

El sustituto muNKP46-huBCMA Fc WT NKCE no indujo una actividad estadísticamente significativa en las dosis de 5, 0.5 y 0.05 mg/kg en el modelo diseminado de EL4-huBCMA (en comparación con el grupo de NKCE de control). Por el contrario, el sustituto muNKP46-huBCMA Fc ADE NKCE indujo una actividad estadísticamente significativa en las dosis de 5 y 0.5 mg/kg, con un ILS >100 % y un 90 % de supervivencia a largo plazo. La dosis más baja de 0.05 mg/kg no indujo una actividad estadísticamente significativa.

En conclusión, el sustituto muNKP46-huBCMA Fc ADE NKCE mostró una mejor actividad que el sustituto WT Fc, de manera dependiente de la dosis.

15 **Tabla 11: Curvas de Kaplan-Meier para el sustituto muNKP46-huBCMA Fc WT y Fc-ADE CODV-OL1 en ratones huFcgr-Tg portadores de células tumorales EL4-huBCMA diseminadas**

	Grupo	Supervivientes a largo plazo	Tiempo de supervivencia medio en días	Aumento de la esperanza de vida
20	muNKP46-huBCMA Fc WT a razón de 5 mg/kg	40%	52	17%
	muNKP46-huBCMA Fc WT a razón de 0.5 mg/kg	40%	60	35%
	muNKP46-huBCMA Fc WT a razón de 0.05 mg/kg	50%	73	64%
	muNKP46-huBCMA Fc ADE a razón de 5 mg/kg	90%	>90	102%
	muNKP46-huBCMA Fc ADE a razón de 0.5 mg/kg	90%	>90	102%
	muNKP46-huBCMA Fc ADE a razón de 0.05 mg/kg	40%	43	-

	Grupo	Supervivientes a largo plazo	Tiempo de supervivencia medio en días	Aumento de la esperanza de vida
5	muNKp46-X Control			
	Fc WT a razón de 5 mg/kg	20%	44.5	-

Ejemplo 11: Estabilidad química/integridad del enlace disulfuro R292C V302C dentro de la molécula NKp46-BCMA CODV-OL1 en condiciones de reducción

Introducción

La genomaniplación de enlaces disulfuro (DSB, por sus siglas en inglés) en el dominio Fc CH2 aumenta la estabilidad. Véase la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. con N.º de serie 63/193,665, incorporada en su totalidad por referencia en el presente documento. Para garantizar que el DSB genomaniplado, R292C_V302C y las mutaciones ADE (G236A/S239D/I332E) dentro de la molécula NKp46-BCMA CODV-OL1 no influyan de manera aberrante en el comportamiento de reducción del DSB, se midió la tasa de reducción mediante DTT y el posterior mapeo de péptidos tripticos.

Material y métodos

Ensayo de sensibilidad de reducción

Se realizó una dilución en serie de DTT en PBS-E (concentraciones finales de DTT en el ensayo: 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 y 0.1 mM). Los lotes de proteínas FF-20-819-1, FF-20-821-1 y FF-21-170-5 se dializaron en tampón PBS-E usando columnas de desalinización por centrifugación para garantizar que se obtuviera un pH de 7.2 durante la reducción. Las muestras de proteínas se normalizaron a 1.5 mg/ml en PBS-E. Se añadieron dos partes de la muestra normalizada a una parte de cada dilución de DTT en una placa de PCR y se mezclaron después de la adición. Esta etapa se realizó desde la concentración más baja a la más alta de DTT en un minuto. La reducción se realizó mediante incubación a 25 °C durante 10 minutos en un termobloque Thermostat C. La reacción se interrumpió mediante la adición de 3 partes de solución madre de NEM a todos los pocillos. Para garantizar la consistencia del ensayo, la adición de NEM se realizó desde la concentración más baja a la más alta de DTT en un minuto y se mezcló después de la adición. La placa preparada se almacenó a temperatura ambiente hasta la medición por electroforesis capilar en gel (cGE) y espectrometría de masas (mapeo de péptidos).

La **Tabla 12** y la **Tabla 13** a continuación contienen la lista de reactivos y materiales para el ensayo de sensibilidad de reducción y la electroforesis capilar en gel, respectivamente.

Tabla 12 - Lista de reactivos y materiales para el ensayo de sensibilidad de reducción

Reactivo/material	Fabricante	N.º de catálogo	Conc. de solución madre
Tampón PBS a pH 7.2	Gibco/Thermo-Fisher	20012043	1x

5	Ditiotreitol (DTT)	Pierce/Thermo-Fisher	A39255	sólido, resuelto en PBS-E a 100 mM
	N-etilmaleimida (NEM)	Pierce/Thermo-Fisher	23030	sólido, resuelto en PBS-E a 200 mM
	Invitrogen EDTA, pH 8.0	Thermo-Fisher	AM9260G	0.5 M
	Placa de 96 pocillos de cubierta dura	Bio-Rad	HSP9601	/
	Columnas de desalinización por centrifugación, 7K MWCO	ZEBA	89883	/
10	Instrumento	Fabricante	N.º de catálogo	
	Termobloque Thermostat C	Eppendorf	5383000027	
	Tampón de ensayo	Composición		
	PBS-E	Tampón PBS 1x Gibco a pH 7.2 + EDTA 1 mM		

Tabla 13 - Lista de reactivos y materiales para la electroforesis capilar en gel (cGE)

15	Reactivo/material	Fabricante	N.º de catálogo	Conc. de solución madre
	Agua, calidad MS	Thermo	N.º 51140	/
	Yodoacetamida (IAM)	Thermo-Fisher	N.º A39271	sólido, resuelto en agua a 250 mM
20	Placa de 96 pocillos de cubierta dura	Bio-Rad	N.º HSP9601	/
	Kit de ensayo Protein Clear HR	PerkinElmer	N.º CLS960014	/
	Chip Protein Clear HR	PerkinElmer	N.º CLS148695	/
	Instrumento	Fabricante	N.º de catálogo	
	LabChip GXII Touch	PerkinElmer	CLS138160	
	Termobloque Thermostat C	Eppendorf	5383000027	
	Tampón de ensayo	Composición/concentración		
	Tampón de muestra no reductor	Tampón de muestra Protein Express + IAM 8.75 mM		

Después de que se realizó el ensayo de sensibilidad de reducción, las muestras se midieron mediante el uso del protocolo no reductor del ensayo Protein Clear HR de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para preparar el chip, se dejó que todos los componentes del ensayo se equilibraran a temperatura ambiente. La matriz de gel Protein Clear HR se mezcló con la solución de colorante Protein Clear HR y se filtró antes de añadirla a los pocillos del chip aclarados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El control de ensayo VeriMAb-standard proporcionado se diluyó en un tampón de muestra no reductor, se desnaturalizó a 70 °C durante 10 minutos, se mezcló con agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se colocó en el instrumento LabChip GXII Touch para la calibración del ensayo. Después de la dilución 1:10 de Protein Clear HR Ladder en agua, los volúmenes indicados de la

solución de escalera y el tampón de lavado Protein Clear HR se transfirieron a los tubos correspondientes y se colocaron en el instrumento LabChip GXII Touch. El proceso de calibración finalizó con éxito antes de medir las muestras.

5 Para preparar las muestras, se añadieron 5 µl de cada muestra procedente del ensayo de sensibilidad de reducción a 18 µl de tampón de muestra no reductor en una placa de PCR, que se selló, y las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 10 min en un termobloque Thermostat C. Después de la desnaturalización, las muestras se diluyeron con 35 µl de agua. La placa de ensayo preparada se almacenó a temperatura ambiente hasta que se midió con el instrumento LabChip GXII Touch.

10 Después de la medición, los datos se analizaron usando el software LabChip Reviewer. Se integraron todos los picos con ≥ 0.85 % de área de pico relativa. El área de pico relativa [%] de la molécula intacta restante se representó gráficamente frente a las concentraciones de DTT y la curva se ajustó mediante un modelo logístico de 4 parámetros/modelo de respuesta a la dosis sigmoidea (Xlfit, Dose Response One Site, modelo 205). El área de la muestra sin adición de DTT se usó para la estandarización y se estableció en 100 %. La concentración de DTT de cada muestra donde quedaba el 50 % de la molécula
15 intacta se usó como valor de CE_{50} para evaluar la sensibilidad de la molécula a la reducción.

Preparación de la muestra de anticuerpos después del ensayo de reducción para experimentos de mapeo de péptidos tripticos

20 Después de realizar el ensayo de sensibilidad de reducción, las muestras se sometieron al procedimiento de digestión. Se desnaturalizaron 100 µg por muestra de anticuerpo usando 0.2 mol/l de cloruro de histidina, 5.6 mmol/l de clorhidrato de guanidinio a pH 6 mediante intercambio de tampón con 0.5 ml de columnas de desalinización por centrifugación Zeba (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 89883). El intercambio de tampón se repitió una vez para asegurar la eliminación completa de NEM. A continuación, las muestras se redujeron mediante la adición de 10 mmol/l de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina, Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo T2556) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, el tampón se intercambió por 20 mmol/l de cloruro de histidina, 0.5 mmol/l de TCEP, pH 6 con 0.5 ml de columnas de desalinización por centrifugación Zeba (Thermo Fisher Scientific, catálogo n.º 89883). Los anticuerpos se digirieron con tripsina durante una noche a 37 °C con una relación enzima-sustrato de 1:20. La digestión se detuvo mediante la adición de 7 µl de solución de ácido fórmico al 10 % y las muestras se congelaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Detección de péptidos modificados mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

Los péptidos se analizaron usando un sistema UHPLC Vanquish™ Flex acoplado a un espectrómetro de masas orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ equipado con la fuente de iones EASY-ETD (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE. UU.).

Para la separación de péptidos se usó un sistema de disolvente binario: (A) ácido fórmico al 0.1 % y (B) acetonitrilo al 90 %, ácido fórmico al 0.1 %. Se separaron 2 µg de muestra digerida con tripsina con un gradiente de 1 h con concentraciones linealmente crecientes de disolvente B durante 50 min, seguido de 5 min con lavado al 95 % de B y 5 min de reequilibrio al 5 % de disolvente B en una columna LC Hypersil

GOLDTM C18 (150 mm x 2.1 mm con tamaño de partícula de 1.9 μm , Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo 25003-152130-V). Los péptidos separados en la columna se detectaron con los siguientes ajustes cruciales: los espectros MS completos se adquirieron a una resolución de 120,000 (definida a 200 m/z) con el intervalo de masas establecido en 375-2000, un objetivo de control de ganancia automático (AGC) de 4.0e5, un tiempo de inyección máximo de 50 ms y 1 μscan . Los espectros dependientes de los datos (MS/MS) se adquirieron en un modo dependiente de los 5 mejores datos usando una resolución de 15,000 (definida a 200 m/z) después de la acumulación de 5.0e4 obtenidos de AGC dentro de un tiempo de inyección de 200 ms. Los iones se aislaron en una ventana de aislamiento de 1.6 Th y se fragmentaron usando HCD, EthcD o EtcID a una energía de colisión normalizada del 30 %. La exclusión dinámica se estableció en 10 s.

Procesamiento de datos

Los datos de MS adquiridos se procesaron usando el software Expressionist (GeneData versión 13.5) y se inspeccionaron manualmente para garantizar la asignación correcta y la precisión de cuantificación relativa. Los espectros de masas se buscaron en relación con la secuencia de aminoácidos de la molécula de muestra. Los ajustes cruciales son las tolerancias de masa para los espectros de MS y MS/MS que se establecieron en 10 ppm, respectivamente. Las modificaciones postraduccionales consideradas dentro de los parámetros de búsqueda fueron la modificación de NEM en cisteínas y las glucosilaciones en el extremo N comunes usando la biblioteca de N-glucanos de IgG de Expressionist.

Resultados

Los valores de CE50 se calcularon a partir de las curvas de respuesta a la dosis como se muestra en la **figura 22**. Las reducciones del pico principal de la muestra no reducida por DTT medidas por electroforesis capilar (cGE) fueron idénticas para CODV-OL1 wt, CODV-OL1 ADE y CODV-OL1 ADE-DSB, lo que indica que ni la mutación ADE ni el enlace disulfuro genomanipulado en el dominio CH2 tienen influencia en la sensibilidad de reducción de la proteína.

Las proteínas, CODV-OL1 wt, CODV-OL1 ADE y CODV-OL1 ADE-DSB, del ensayo de sensibilidad a la reducción analizadas mediante mapeo de péptidos, muestran un comportamiento de reducción similar de los enlaces disulfuro (DSB) intermoleculares sensibles a la reducción, como se muestra en la **figura 23A** (CODV-OL1 wt), la **figura 23B** (CODV-OL1 ADE) y la **figura 23C** (CODV-OL1 ADE-DSB). Basándose en las curvas de respuesta a la dosis, se estimaron valores de CE50 para las tres proteínas en el intervalo de 1.2-1.5 mM de DTT, lo que indica que el DSB genomanipulado es estable a la reducción de manera similar que un DSB intermolecular típico.

CODV-OL1 wt, CODV-OL1 ADE y CODV-OL1 ADE-DSB - Rendimientos de expresión

Los anticuerpos se produjeron de la siguiente manera:

Los plásmidos de expresión que codificaban las diferentes cadenas de las construcciones correspondientes se propagaron en DH5a de *E. coli*. Los plásmidos usados para la transfección se prepararon a partir de *E. coli* con kits EndoFree Plasmid Mega (Qiagen). Las células HEK 293-FS que crecían en un cultivo en suspensión sin suero F17 (Invitrogen) se transfectaron con los plásmidos indicados usando el reactivo de transfección de polietilenimina. Después de 6 días de cultivo a 37 °C con CO₂ al 8 %,

las células se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 μ m para eliminar las partículas. Las proteínas se capturaron en MabSelect SuRe (Cytiva), se eluyeron con un tampón de citrato 0.1 M a pH 3.0 y se neutralizaron con Tris 1 M a pH 9. Después de pulir las proteínas mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando Superdex200 26/60 (Cytiva) y una filtración de 0.22 μ m y la determinación de la concentración con UV280, las proteínas se usaron para una caracterización adicional. Los rendimientos se indican a continuación en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Rendimiento de anticuerpos con un IgG1 de tipo natural o con dominio Fc mejorado, con o sin enlace disulfuro

Clon	Rendimiento de la muestra (mg/l)
CODV-OL1-WT	25.2
CODV-OL1-DE-R292C/V302C	21.7
CODV-OL1-ADE-R292C/V302C	25.7

El anticuerpo con una cadena principal Fc de IgG1 normal demostró un rendimiento de muestra de 25.2 mg/l, mientras que los anticuerpos con mutaciones ADE o DE en la cadena principal Fc muestran una fuerte reducción por debajo de 5 mg/l en los rendimientos de muestra. Los anticuerpos con una Fc de IgG1 con mutaciones ADE o DE y con el enlace disulfuro demostraron un rendimiento de muestra similar al WT.

Ejemplo 12: Liberación de citocinas *in vitro* en PBMC en cocultivo con células tumorales de MM RPMI 8226 BCMA positivas con NKp46-BCMA Fc-ADE-DSB

Material y métodos

Procedimiento de seguridad *in vitro* para IncuCyte S3 (PBMC + MM1R-RFP, relación de efector:diana = 3:1)

Un día después de la purificación de PBMC, se contaron tanto las PBMC como las MM1R-RFP en un Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea).

Células diana: La línea celular MM1R se adquirió en ATCC/Northwestern University BDW y se transfectó con lentivirus Incucyte Nuclight Red (EssenBiosciences, ref. n.º 4476) para expresar la proteína fluorescente roja (RFP) mKate2 que se puede seguir durante varios días con la incubadora Incucyte. La selección de células MM1R-RFP se obtuvo mediante la adición de clorhidrato de puromicina hidrato (Thermo Scientific, Dinamarca, ref. n.º 10781691) a la concentración final de 1 μ g/ml en el medio de cultivo [medio RPMI 1640 (1x) (GIBCO, Dinamarca, ref. n.º 31870-025) con el 20 % de suero bovino fetal, FBS inactivado por calor (Biowest, ref. n.º S140H-100) y el 1 % de L-glutamina 200 mM (100x) (GIBCO, Dinamarca, ref. n.º 25030-024)].

Dado que las células MM1R-RFP son semiadherentes, el medio de cultivo se eliminó y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml junto con los 5 ml de PBS 1x usados para lavar el matraz Nunc EasY de 75 cm² (Thermo Scientific, Dinamarca). Las células adherentes restantes se desprendieron añadiendo 1 ml/matraz de 75 cm² de solución de desprendimiento de células Accutase (Corning, ref. n.º 25-058-CI). La acción de Accutase se detuvo después de 5 min a 37 °C con 9 ml de medio de cultivo (RPMI + FBS al 20 %, volumen final de 10 ml) y las células MM1R-RFP se contaron en un Vi-Cell XR. Se preparó la cantidad adecuada de

células y se sembró a una densidad de 30 000 células/pocillo (50 µl/pocillo) para tener una relación de E:D de 3:1.

Anticuerpos: Todos los Ab se prepararon concentrados 2x (ya que se añadieron 50 µl de células diana + 100 µl de Ab 2x + 50 µl de PBMC por cada pocillo) en medio de cultivo RPMI. Los anticuerpos usados para el experimento se diluyeron 1/100 veces en medio de cultivo en placas Deepwell (Axigen, ref. n.º P-DW-11-C-S). La concentración de partida para todos los Ab fue de 1000 nM (por lo que se calcularon 2000 nM), excepto para el activador de linfocitos T CD3-BCMA cuya concentración inicial fue de 100 nM (por lo que se calcularon 200 nM) y se realizaron 3 diluciones.

Células efectoras: Las PBMC totales se prepararon a una densidad de 300 000 células/pocillo (50 µl/pocillo) (relación de E:D de 3:1). Después del recuento, las PBMC necesarias se centrifugaron a 300 g durante 5 min (aceleración = 9, frenado = 9) y se suspendieron de nuevo en el volumen adecuado de medio de cultivo RPMI con la IgG humana a una concentración de 4 mg/ml (Sigma-Aldrich, ref. n.º I4506) de modo que la concentración final fue de 1 mg/ml en 200 µl de volumen final/pocillo: [50 µl de MM1R-RFP + 100 µl de anticuerpos (2x) + 50 µl de PBMC].

Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos de poli D (Greiner bio-one, ref. n.º 655946) y los pocillos externos se llenaron con 200 µl de PBS 1x.

Después de sembrar las células tumorales (50 µl/pocillo) + Ab (100 µl/pocillo) + PBMC (50 µl/pocillo), la placa se centrifugó a 100 g durante 1 min a TA y se colocó en la incubadora de IncuCyte S3 (Essen BioScience), pero la placa se leyó solo después de al menos 30 min para evitar diferencias de temperatura.

Se usaron los siguientes parámetros para leer la placa en Incucyte S3: Tipo de análisis (analizador básico), RED, objetivo 10x, 4 imágenes/pocillo, puntos temporales 48 h (imágenes cada 4 h), tiempo de adquisición 400 ms.

Después de 48 h, el escáner Incucyte se detuvo y la placa se centrifugó a 300 g durante 5 min, a continuación se recogieron 100 µl de sobrenadante/pocillo para realizar el análisis de liberación de citocinas mediante el kit Human Proinflammatory I (4-Plex) V-Plex.

Procedimiento para el análisis de liberación de citocinas mediante el kit Human Proinflammatory I (4-Plex) V-Plex

Para el análisis de liberación de citocinas se usó el kit Human Proinflammatory I (4-Plex) V-Plex (MSD, ref. n.º K15052D-1).

En primer lugar se prepararon los intervalos de control: Se retomó el tubo liofilizado con 1000 µl de Diluyente 2 (Calibrador, ref. n.º C0049-2) y se dejó en reposo durante 30 min. Se realizaron 7 diluciones sucesivas de ¼ en el Diluyente 2 (es decir, 75 µl de Cx + 225 µl de Diluyente 2); el último tubo n.º 8 se consideró como control negativo (Diluyente 2 solo = Cero), mientras que en el tubo n.º 1 no se diluyó la solución de partida.

A continuación, se prepararon muestras con una dilución de 1/100 para DART (es decir, 50 µl/pocillo, preparación de 5 µl de DART/concentración + 495 µl de Diluyente 2) y 1/5 (es decir,

50 µl/pocillo, preparación de 100 µl de Ab/concentración + 400 µl de Diluyente 2) para los demás anticuerpos.

El anticuerpo secundario se preparó en el Diluyente 3: 100 µl de IFN γ + 100 µl de IL1 β + 100 µl de IL6 + 100 µl de TNF α + 4600 µl de Diluyente 3 (volumen final de 5 ml) y a continuación se distribuyeron 25 µl de la mezcla de Ab secundarios en cada pocillo.

Antes de añadir las muestras a la placa, esta se lavó 3 veces con 150 µl de PBS 1x tween al 0.05 % (tampón de lavado preparado con: 500 µl de Tween20 en 1 l de PBS 1x). A continuación, se añadieron 50 µl/pocillo de las muestras diluidas a ensayar y 50 µl/pocillo del intervalo estándar. La placa se cubrió con un film y se dejó durante 2 horas en agitación a TA.

La placa se lavó 3 veces con 150 µl de tampón de lavado y se añadieron 25 µl de Ab secundario a las muestras (la placa se golpeó para una mejor distribución del Ab secundario) y la placa se volvió a cubrir con film y se dejó durante 2 horas en agitación a TA. Se realizaron 3 etapas de lavado con 150 µl de tampón de lavado y se añadieron 150 µl de tampón de lectura en todos los pocillos [tampón de lectura (4x) preparado mediante una dilución 1/2 en H₂O]. La placa se leyó en el instrumento MSD 1250.

Resultados:

Como se muestra en la **figura 24A** y la **figura 24B**, NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB medió en una potente citotoxicidad de las células que expresaban BCMA, pero condujo a una liberación mínima de citocinas de las PBMC en un cocultivo. Como se muestra en la **figura 25A** y la **figura 25B**, NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB también medió en una proliferación reducida de células tumorales MM1R mientras que desencadenó mínimamente la liberación de citocinas. La liberación reducida de citocinas *in vitro* es indicativa de un perfil de seguridad favorable.

Ejemplo 13. Caracterización *in vitro* de NKCE sobre la activación de linfocitos NK y la producción de citocinas/quimiocinas por los linfocitos NK en reposo en presencia de células de MM.

Este ejemplo se diseñó para caracterizar la eficacia *in vitro* de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en la activación y la producción de citocinas/quimiocinas de linfocitos NK en presencia de una línea celular BCMA positiva (células de mieloma múltiple RPMI 8226).

Material y métodos

Células mononucleares de sangre periférica: Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC), las capas leucocitarias se diluyeron a ~1/5 en RPMI y se transfirieron a tubos Pancoll a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 800 g durante 20 min sin frenada. El primer lavado de células se realizó en RPMI con una centrifugación a 400 g durante 10 min a temperatura ambiente con frenada. Se realizó un segundo lavado de células en RPMI con una centrifugación a 130 g durante 10 min a temperatura ambiente con frenada.

Recogida de linfocitos NK: Los linfocitos NK humanos se purificaron a partir de una muestra de PBMC con un kit de aislamiento de linfocitos NK (Miltenyi) mediante selección negativa usando marcaje magnético manual y una posterior separación manual con columnas LS de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor. A continuación, los linfocitos NK se cultivaron en RPMI completo a razón

de 1×10^6 células/ml durante aproximadamente 24 horas a 37 ± 1 °C con CO_2 al 5 ± 1 % antes de usarse en un ensayo de activación (las denominados linfocitos NK "en reposo").

El criterio de viabilidad para las células efectoras se estableció en ≥ 90 %. La expresión de la superficie celular de CD16a y NKp46 en linfocitos NK en reposo se controló mediante citometría de flujo el día del experimento.

Ensayo de activación de linfocitos NK

Se añadieron moléculas de NKCE a los pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se añadieron sucesivamente 50,000 linfocitos NK en reposo (es decir, no activados) y 50,000 células de MM RPMI 8226 a cada pocillo para obtener una relación de efector:diana (E:D) de 1:1. Las condiciones de control se realizaron añadiendo solo 50,000 linfocitos NK en reposo a cada pocillo. Se añadió la solución GolgiStop™ (BD Biosciences) a una dilución final de 1/1500 en cada pocillo (control y experimental) para bloquear el transporte intracelular de proteínas fuera de las células, lo que dio lugar a la acumulación de citocinas en el complejo de Golgi. Se realizó un control positivo de la activación de los linfocitos NK usando una concentración final de 125 ng/ml de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) y una concentración final de 1 µg/ml de ionomicina añadida a 50,000 linfocitos NK en reposo. Cada condición se realizó de forma simplificada.

Después de 4 horas de incubación conjunta a 37 ± 1 °C, las células se tiñeron realizando una tinción para marcadores extracelulares (CD3, Cd56, CD69, CD107a y CD107b) para el análisis de citometría de flujo. Después de las etapas de fijación y permeabilización, se realizó una tinción intracelular para IFN γ , TNF α y MIP1 β . Las células se fijaron usando Cytofix (BD Biosciences) durante 15 minutos después de la última tinción y se analizaron por citometría de flujo con un LSR Fortessa™ X-20. Los parámetros FSC-A, FSC-H, FSC-W, SSC-A, SSC-H, SSC-W, FL-1, FL-3, FL-6, FL-7, FL-9, FL-13 y FL-16 se registraron con el software BD FACSDiva y los análisis se realizaron con el software FlowJo.

El análisis del porcentaje de activación de los linfocitos NK y la intensidad de fluorescencia media (IFMed) de los marcadores de activación se realizaron con GraphPad Prism. Los valores más altos de activación correspondieron a la activación máxima observada. Los valores de concentración eficaz máxima media (CE_{50}) se calcularon usando un modelo de regresión no lineal de logística de 4 parámetros correspondiente a la siguiente ecuación:

$$NK \text{ cell activation (\%)} = \text{calculated bottom} + \frac{\text{calculated top} - \text{calculated bottom}}{1 + 10^{[(\log](\text{EC50}) - \log(\text{concentration})) \text{slope}]}}$$

El valor inferior de activación calculado, el valor superior de activación calculado, la pendiente y el intervalo de confianza del 95 % (IC) se calcularon usando el mismo modelo que la CE_{50} .

Análisis de citometría de flujo para determinar la pureza y el fenotipo de los linfocitos NK en reposo y las células diana

Los linfocitos NK en reposo, usados para los experimentos de activación de linfocitos NK, se analizaron en términos de pureza, expresión de CD16a y NKp46. Las células de MM RPMI 8226 se analizaron para determinar la expresión de CD32 y BCMA.

La tinción de los linfocitos NK en reposo y las células diana se realizó el día del experimento. Se tiñeron 1×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U con anticuerpos acoplados a colorantes (aloficocianina, azul del Pacífico o ficoeritrina).

Resultados:

5 La activación de los linfocitos NK se evaluó mediante: 1) la expresión de marcadores de activación (CD69 y CD107a/b) en la superficie celular y 2) la producción intracelular de citocinas (IFN γ , TNF α) y quimiocinas (MIP1 β). Se evaluaron siete donantes de linfocitos NK en el estudio.

10 Como se muestra en la figura 26A-figura 26D en ausencia de células de MM RPMI 8226, PMA-ionomicina, un control positivo, activó los linfocitos NK al inducir la expresión de CD69 y CD107a/b. Por el contrario, NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y el NKCE de control indujeron una activación de respuesta a la dosis no sigmoidea desde 4.88 ng/ml hasta alcanzar la concentración más alta (4.88 μ g/ml) aproximadamente el 40 % de las células CD69 positivas (IFMed de CD69 de aproximadamente 150) y el 14 % de células CD107 positivas (IFMed de CD107 de aproximadamente 90).

15 En presencia de células de MM RPMI 8226, los linfocitos NK no se activaron en ausencia de la molécula. La adición del NKCE de control indujo un bajo nivel de activación de los linfocitos NK similar a la activación obtenida en ausencia de células diana. La adición de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB indujo una respuesta a la dosis sigmoidea para la activación de los linfocitos NK mayor que la activación obtenida con el NKCE de control. Más precisamente, se observó una fase de saturación para NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a aproximadamente 48.8 ng/ml para la expresión CD69 (aproximadamente el 60 % de las células positivas y una IFMed de 351 en los linfocitos NK) y para la expresión de CD107a/b (aproximadamente el 22 % de las células positivas y un IFMed de 132 en los linfocitos NK) (Tabla 15).

Tabla 15. Valores superiores observados de activación de linfocitos NK obtenidos para la expresión de CD69 y CD107a/b en el ensayo de activación de linfocitos NK en presencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y células de MM RPMI 8226.

Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	Valor superior de activación (% de linfocitos NK positivos)							Valor superior de activación medio (% de linfocitos NK positivos)	DE del valor superior de activación (% de linfocitos NK positivos)
		D09 1	D58 4	D81 9	D01 8	D04 2	D10 1	D23 6		
CD69	ESB1	68	51	72	70	43	70	45	60	13
CD107a/b		25	20	14	24	24	30	18	22	5
Marcador de	Molécula	Valor superior de activación (IFMed en linfocitos NK)							Valor superior	DE del valor

activación de linfocitos NK		D09 1	D58 4	D81 9	D01 8	D04 2	D10 1	D23 6	de activació n medio (IFMed en linfocitos NK)	superior de activació n (IFMed en linfocitos NK)
CD69	ESB1	398	237	428	572	208	390	223	351	134
CD107a/b		133	100	91	191	149	145	117	132	34

Dado que se obtuvieron la fase de saturación y la respuesta a la dosis sigmoidea para NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para la expresión de CD69, la CE_{50} se extrajo de los siete donantes seleccionados (Tabla 16). Dado el nivel de producción de CD107a/b (aproximadamente o por debajo del 20 % de células positivas para 3 de los 7 donantes), no se estimó ninguna CE_{50} para el marcador de activación de CD107a/b.

Tabla 16. Valores de CE_{50} obtenidos en el ensayo de activación de linfocitos NK para la expresión de CD69 en presencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y células de MM RPMI 8226.

Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	CE_{50} (pg/ml) [IC del 95 %]							Media geométrica de CE_{50}
		D091	D584	D819	D018	D042	D101	D236	(pg/ml) [IC del 95 %]
CD69 (%) de linfocitos NK positivos)	ESB1	1394 [525, 4467]	2229 [1657, 3011]	1420 [865, 2365]	1096 [1023, 1175]	3511 [1873, 7161]	894 [592, 1384]	2644 [979, 9969]	1695 [1072, 2679]
CD69 (IFMed en linfocitos NK)	ESB1	12510 [2485, 6.67 ^{E+11}]	10510 [7041, 16320]	2882 [1290, 7171]	3507 [3179, 3847]	9867 [3754, 50980]	2585 [1126, 7443]	39430 [5128, ND]	7501 [3014, 18670]
Marcador de activación de	Molécula	CE_{50} (pM)							Media geométrica de CE_{50} (pM)
		D091	D584	D819	D018	D042	D101	D236	[IC del 95 %]

5	linfocitos NK									
	CD69 (% de linfocitos NK positivos)	ESB1	11.2	17.8	11.4	8.8	28.1	7.2	21.2	13.6 [8.6, 21.4]
10	CD69 (IFMed en linfocitos NK)	ESB1	100.1	84.1	23.1	28.1	78.9	20.7	315.4	60.1 [24.1, 149.4]

Secreción de IFN γ , TNF α y MIP1 β por los linfocitos NK

En el mismo experimento, se midió la producción de citocinas intracelulares (IFN γ y TNF α) y la quimiocina MIP1 β por los linfocitos NK. La liberación de TNF α , IFN γ y MIP1 β fue proporcional a la activación de linfocitos NK: una mayor activación de linfocitos NK dio como resultado una mayor producción de citocinas/quimiocinas (**figura 27A-figura 27F**).

En ausencia de células de MM RPMI 8226 y NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB, los linfocitos NK no produjeron TNF α ni IFN γ detectables, sin embargo, aproximadamente el 80 % de los linfocitos NK produjeron MIP1 β . La adición de un control positivo (PMA-ionomicina) indujo la producción de TNF α (~84 % para D584), IFN γ (~83 % para D584) y aumentó MIP1 β (~100 % para D584) por parte de los linfocitos NK. Por el contrario, la adición de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB indujo una expresión muy baja dependiente de la diana de IFN γ y TNF α , de manera dependiente de la dosis, con un valor superior de activación observado por debajo del 20 % de las células positivas (8 ± 5 % para IFN γ y 12 ± 7 % para TNF α). Se produjo MIP1 β por los linfocitos NK a partir de 4.88 ng/ml hasta alcanzar aproximadamente el 95 % de las células positivas (IFMed de MIP1 β de aproximadamente 5400 en linfocitos NK) en una respuesta a la dosis de las dos moléculas.

Los resultados mostraron que la presencia de células de MM RPMI 8226 por sí solas no fue suficiente para inducir la secreción de citocinas por los linfocitos NK en ausencia de moléculas de NKCE. La adición de moléculas de NKCE de control a altas concentraciones indujo una producción baja o muy baja de citocinas por los linfocitos NK e indujo una alta producción de MIP1 β con una respuesta a la dosis sigmoidea. La adición de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB indujo la producción de citocinas y quimiocinas. Para las tres citocinas/quimiocinas, el nivel máximo de producción se alcanzó a una concentración que variaba entre 4.88 y 48.8 ng/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB según el donante. Para los siete donantes evaluados, el porcentaje de linfocitos NK que producen TNF α o IFN γ fue de aproximadamente 12 ± 7 (IFMed de TNF α en linfocitos NK: 39 ± 7) y 8 ± 5 (IFMed de IFN γ en linfocitos NK: 137 ± 30), respectivamente, y el porcentaje de linfocitos NK que producen MIP1 β fue de aproximadamente 94 ± 2 .

(IFMed de MIP β en linfocitos NK: 10145 $\pm$ 4416) a las concentraciones más altas de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (Tabla 17).

Dado que se obtuvieron la fase de saturación y la respuesta a la dosis sigmoidea para NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para la producción de TNF α , IFN γ y MIP1 β , se observó el valor superior de activación (TNF α , IFN γ y MIP1 β) y la CE₅₀ para MIP1 β de los siete donantes evaluados. Dado el nivel de producción de TNF α e IFN γ (por debajo del 20 % de células positivas), no se estimó ninguna CE₅₀ para estas dos citocinas (Tabla 18).

Tabla 17. Valores superiores observados de activación de linfocitos NK obtenidos en el ensayo de activación de linfocitos NK en presencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y células de MM RPMI 8226.

Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	Valor superior de activación (% de linfocitos NK positivos)							Valor superior de activación medio (% de linfocitos NK positivos)	DE del valor superior de activación (% de linfocitos NK positivos)
		D091	D58 4	D81 9	D01 8	D04 2	D101	D236		
TNF α	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	14	9	9	0	13	15	23	12	7
IFN γ		12	5	4	0	6	16	11	8	5
MIP1 β		97	97	95	94	90	93	94	94	2
Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	Valor superior de activación (IFMed en linfocitos NK)							Valor superior de activación medio (IFMed en linfocitos NK)	DE del valor superior de activación (IFMed en linfocitos NK)
		D091	D58 4	D81 9	D01 8	D04 2	D101	D236		
TNF α	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	44	40	41	27	36	37	50	39	7
IFN γ		195	120	138	97	131	132	148	137	30
MIP1 β		12923	9428	7233	3679	7547	16239	13968	10145	4416

Tabla 18. Valores de CE_{50} obtenidos en un ensayo de activación de linfocitos NK para la expresión de MIP1 β en presencia de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y células de MM RPMI 8226.

5	Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	CE_{50} (pg/ml) [IC del 95 %]							Media geométrica de CE_{50}
			D091	D584	D819	D018	D042	D101	D236	(pg/ml) [IC del 95 %]
10	MIP1 β (% de linfocitos NK positivos)	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	92 [73, 116]	105 [88, 126]	115 [101, 132]	134 [97, 186]	312 [239, 405]	164 [95, 284]	126 [87, 183]	138 [95, 201]
15	MIP1 β (IFMed en linfocitos NK)	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	4436 [1650, 19230]	3276 [2652, 4059]	2012 [1192, 3480]	434 [161, 823]	4237 [2159, 9387]	1660 [1036, 2669]	3627 [1377, 13640]	2283 [1069, 4878]
20	Marcador de activación de linfocitos NK	Molécula	CE_{50} (pM)							Media geométrica de CE_{50} (pM)
			D091	D584	D819	D018	D042	D101	D236	[IC del 95 %]
	MIP1 β (% de linfocitos NK positivos)	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	0.7	0.8	0.9	1.1	2.5	1.3	1.0	1.1 [0.7, 1.6]
	MIP1 β (IFMed en linfocitos NK)	NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB	35.5	26.2	16.1	3.5	33.9	13.3	29.0	18.3 [8.6, 39.0]

Ejemplo 14: Análisis de liberación de citocinas *in vitro* de NKp46-BCMA Fc-ADE-DSB usando células de sangre completa de donantes humanos cocultivadas y línea celular RPMI (mieloma múltiple)

Introducción

5 Para evaluar la variabilidad/intervalo de respuesta observado en este ensayo, se obtuvieron células de sangre completa de 11 donantes humanos que se cocultivaron con células RPMI-8226-RFP que se trataron con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB o controles negativos o positivos. Los cocultivos se incubaron durante una noche a 37 °C con 1, 10, 100 y 300 µg/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB preparado a partir de dos lotes diferentes (CER o GMP) o con controles negativos o positivos como se detalla en la sección de materiales y métodos a continuación. Los grupos de control de tratamiento incluyeron dos controles negativos (cocultivo sin tratar y cocultivo tratado con control de isotipo a razón de 300 µg/ml) y tres controles positivos: un activador de linfocitos T anti CD3/CD28 humano (25 µg/ml; ImmunoCult™), un anticuerpo recombinante anti CD52 (alemtuzumab, 100 µg/ml; Campath-1H®), y un compuesto de herramienta de activación de linfocitos T BCMA interna (TCE-BCMA, 100 µg/ml).

15 **Materiales y métodos**

La línea celular RPMI 8226 se obtuvo de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, EE. UU.) y se transfectó con proteína fluorescente roja (RFP). Estas células RPMI 8226-RFP modificadas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y penicilina-estreptomicina al 1 % (10,000 U/ml, Thermo Fisher Scientific, Inc.) a +37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %.

El día del ensayo de liberación de citocinas, se contaron las células y se evaluó su viabilidad en un Cellometer (Nexcelcom, Lawrence, MA, EE. UU.). Las células RPMI-8226-RFP se ajustaron a una concentración de 800,000 células/ml y se sembraron 25 µl de células por pocillo para una densidad final de 20,000 células por pocillo en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y los controles se disolvieron en medio RPMI 1640, GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, Inc.) complementado con suero bovino fetal al 10 % p/v y penicilina-estreptomicina al 1 % (10,000 U/ml). Se añadieron 25 µl de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB y controles por pocillo por triplicado. Los controles negativos fueron medio solo y control de isotipo a una concentración final de 300 µg/ml. Los controles positivos con sus respectivas concentraciones se han enumerado anteriormente, y también se etiquetan en la **figura 28-figura 32**.

Se extrajo sangre completa de 11 donantes que dieron su consentimiento mediante venopunción en tubos Vacutainer de 10 ml que contenían anticoagulante de heparina de sodio. Las muestras se mezclaron suavemente y se mantuvieron en condiciones ambientales hasta el inicio del estudio. Después de la adición de células RPMI-8226-RFP a un grupo NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB o a un grupo de control de tratamiento, se añadieron a continuación muestras de sangre completa fresca (200 µl) de los donantes a los pocillos y las placas se incubaron a +37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % durante 24 horas.

Al final del período de incubación, las placas se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. Se recogió el plasma de estas placas, a continuación se transfirió directamente a una nueva placa de cultivo celular de 96 pocillos y a continuación se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos para eliminar los restos celulares restantes. Las muestras de plasma finales se transfirieron a nuevas placas de cultivo de 96 pocillos y se usaron para la evaluación inmediata de los niveles de citocinas.

Se evaluaron muestras de plasma para determinar los niveles de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF; intervalo de cuantificación de 0.33-10,200 pg/ml), interferón gamma (IFN- γ ; intervalo de cuantificación de 9.45-27,000 pg/ml), interleucina-1 beta (IL-1 β ; intervalo de cuantificación de 0.35-4430 pg/ml), interleucina-2 (IL-2; intervalo de cuantificación de 1.24-1990 pg/ml), interleucina-4 (IL-4; intervalo de cuantificación de 0.16-1,780 pg/ml), interleucina-6 (IL-6; intervalo de cuantificación de 0.89-2,050 pg/ml), interleucina-8 (IL-8; intervalo de cuantificación de 0.35-2,180 pg/ml), interleucina-10 (IL-10; intervalo de cuantificación de 0.35-3,770 pg/ml), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α ; intervalo de cuantificación de 14.5-5,580 pg/ml), y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α ; intervalo de cuantificación de 0.66-2,940 pg/ml) usando un ensayo MSD U-PLEX (n.º de catálogo K15067L-2; lote n.º 404471) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mesoscale Discovery, Rockville, Maryland, EE. UU.).

Los niveles de citocinas se definieron usando curvas de calibración para cada citocina ajustando las señales de los patrones de calibración a un modelo de respuesta a la dosis logístico o sigmoideo de 4 parámetros con una ponderación de $1/Y^2$. Los cálculos para determinar las concentraciones de citocinas se llevaron a cabo usando el análisis MSD DISCOVERY WORKBENCH versión 4.0 (Mesoscale Discovery, Rockville, Maryland, EE. UU.) y las concentraciones se expresaron en unidades de pg/ml.

Se analizaron los datos de citocinas (por triplicado) y se calculó el coeficiente de variación (% de CV) entre triplicados usando el software GraphPad Prism, versión 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Para el análisis se usó un cálculo de pendiente variable de cuatro parámetros de respuesta a la dosis sigmoidea con una restricción inferior establecida en 0. Las muestras donde se produjeron errores técnicos y no se detectó nada se informaron como no detectadas (ND). Las muestras con una concentración igual o inferior al límite inferior de cuantificación (LLOQ) se informaron como el LLOQ y este valor se usó en todos los cálculos. Las muestras con una concentración superior al límite superior de cuantificación (ULOQ) se informaron como el valor extrapolado obtenido y este valor se usó en todos los cálculos. Se calculó un factor de cambio en el nivel de citocinas [media global (con DE) y mediana (con C1 y C3: primer y tercer cuartil)] para cada muestra tratada en relación con el control negativo (cocultivo sin tratar).

Resultados

Como se muestra en la **figura 28-figura 32**, los controles positivos, anti CD3/CD28 y TCE-BCMA, demuestran fuertes aumentos en la liberación de citocinas para IFN- γ (**figura 28A**), MIP-1 α (**figura 28B**), TNF- α (**figura 29A**), IL-1 β (**figura 29B**), IL-6 (**figura 30A**), IL-8 (**figura 30B**), IL-2 (**figura 31A**), GM-CSF (**figura 31B**), IL-4 (**figura 32A**) e IL-10 (**figura 32B**) en comparación con los controles negativos (sin tratar y control de isotipo). El control positivo, anti CD52, indujo la liberación de citocinas de IFN- γ (**figura 28A**),

IL-6 (**figura 30A**), MIP-1 α (**figura 28B**), IL-1 β (**figura 29B**) e IL-8 (**figura 30B**), pero no de citocinas típicamente asociadas con una respuesta de linfocitos T tales como, IL-2 (**figura 28A**), IL-10 (**figura 31A**), GM-CSF (**figura 31B**) o IL-4 (**figura 32A**). Por el contrario, NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB indujo la secreción de IFN- γ (**figura 28A**) y MIP-1 α (**figura 28B**) solamente; no se informó ningún cambio en ninguna de las demás citocinas evaluadas.

Se observó un claro aumento relacionado con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en IFN- γ y MIP-1 α en todos los donantes a todas las concentraciones ensayadas (1, 10, 100 y 300 μ g/ml), en comparación con la sangre completa sin tratar y los cocultivos de RPMI 8226-RFP (control negativo). Los niveles de IFN- γ (**figura 28A**) en las muestras incubadas con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (a todas las concentraciones ensayadas) fueron superiores a los del control negativo (de 3 a 6 veces), pero mucho inferiores a los de los controles positivos. No hubo dependencia de la concentración relacionada con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB con el aumento de IFN- γ , y los niveles fueron comparables al control de isotipo, lo que sugiere que la secreción de IFN- γ estaba relacionada con la activación de los linfocitos NK por NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en lugar de estar relacionada con la actividad de unión a BCMA. Los niveles de MIP-1 α inducidos por NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (**figura 28B**) fueron ligeramente superiores a los del control negativo (1 a 3 veces) pero sorprendentemente inferiores a los de los controles positivos. No hubo diferencia en el perfil de liberación de citocinas entre ambos lotes de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (CER y GMP) ensayados.

En conjunto, los resultados indican que el riesgo de que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB dé como resultado CRS en seres humanos se considera bajo. Estos resultados también corroboran los del ensayo de liberación de citocinas *in vitro* (PBMC) que se muestra en el Ejemplo 12, lo que respalda la conclusión de que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB tiene un perfil de seguridad favorable.

Ejemplo 15: Activación de linfocitos NK y análisis de la lisis de células de MM en respuesta al anticuerpo biespecífico NKp46

Introducción

Este ejemplo evalúa la capacidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para activar linfocitos NK de sangre periférica de MM e inducir la muerte de células de MM mediante citometría de flujo. Las células de MM Karpas 620 como células diana se incubaron conjuntamente con PBMC de pacientes con MM (n = 13, Tabla 18) como células efectoras en una relación de E:D de 10:1 en presencia de una concentración creciente de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB, anticuerpo de control de isotipo (10 mg/ml) o daratumumab (10 mg/ml).

Para ello, se usó NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para tratar células de MM Karpas 620 incubadas conjuntamente con PBMC de pacientes con MM, ya sea en el momento del diagnóstico de MM (N = 2) o en casos de MM en recidiva (N = 11). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la muerte de células de MM por la pérdida de la expresión de CD138. En paralelo, se evaluó la activación de linfocitos NK (CD3⁺CD56^{dim}) por la expresión de CD107a e IFN γ .

Materiales y métodos

(1) *Purificación celular y condiciones de cocultivo.* El día antes del ensayo de lisis de células de MM, las PBMC de pacientes con MM aisladas después de la centrifugación en gradiente de densidad se

tiñeron inmediatamente con CD3-PE y CD56-APC y los resultados se analizaron mediante citometría de flujo antes de la activación de los NK para determinar el porcentaje de células CD3-/CD56+. Cuando los linfocitos NK representaban más del 5 % de los linfocitos, las PBMC se mantuvieron en un medio de cultivo que contenía FCS al 10 % (FCS de Innate Pharma para preservar los linfocitos NK) a 37 °C y CO₂ al 5 % durante una noche. Las PBMC en reposo y la línea celular diana de MM en una relación de 10:1 se cocultivaron en presencia de las moléculas ensayadas durante 4 horas. A continuación, (i) la expresión de marcadores de activación (CD107a) y la producción intracelular de citocinas (IFN γ) en los linfocitos NK y (ii) la muerte de células de MM (CD138) se analizaron mediante citometría de flujo.

(2) *Preparación de células y condiciones del grupo de tratamiento y control.* Se recogieron 300,000 PBMC y 30,000 células diana de MM (Karpas 620) y se contaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U para obtener una relación de células efectoras:diana (E:D) de 10:1. Se mantuvieron 400,000 PBMC en la incubadora para la fenotipificación mínima (CD56, CD3, CD16, NKp46) de los linfocitos NK de los pacientes. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g, se suspendieron de nuevo en un medio que contenía solución BD GolgiSTOP™ (1/6000) y se dispensaron a razón de 300,000 PBMC y 30,000 células de MM por pocillo. Las condiciones de control fueron las siguientes: Los controles negativos fueron Karpas 620, PBMC y Karpas 620 + PBMC sin tratamiento añadido. El control positivo de la activación de NK fue PBMC tratadas con 125 ng/ml de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, Sigma, ref. P8139) y 1 mg/ml de ionomicina (Sigma, ref. I0634). Los grupos de tratamiento fueron el control de isotipo (10 mg/ml), NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (10 mg/ml) añadido a las muestras de cocultivo durante 4 horas a 37 $\pm$ 1 °C y CO₂ al 5 $\pm$ 1 %. Antes de la adición del tratamiento, los anticuerpos se centrifugaron a 16000 x g durante 10 minutos a +4 °C para eliminar posibles agregados.

(3) *Tinción y análisis de citometría de flujo.* Después de 4 horas de incubación conjunta a 37 $\pm$ 1 °C y CO₂ al 5 $\pm$ 1 %, las células se tiñeron extracelular o intracelularmente para el análisis de citometría de flujo. (3a) *Tinción extracelular.* Las células se transfirieron a una placa con fondo en V y se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 x g, el sobrenadante se descartó. Las células se lavaron con 200 μ l de PBS y se centrifugaron de nuevo durante 1 minuto a 1900 x g, descartando el sobrenadante. A cada muestra se le añadieron 50 μ l de tampón de tinción BD pharmingen BSA/tampón de tinción Brilliant más mezcla maestra de anticuerpos. Los anticuerpos usados para la activación de NK y el análisis de la muerte de células de MM se muestran en la **Tabla 19** a continuación. Posteriormente, las células se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 200 μ l de tampón de tinción, se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 g y el sobrenadante se descartó (x2). (3b) *Tinción intracelular.* Las células se suspendieron de nuevo en 100 ml de BD Cytofix/Cytoperm y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces en 200 μ l de tampón BD Perm/Wash 1x (tampón BD Perm/Wash 10x en H₂O destilada), se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 g y el sobrenadante se descartó. Las células se suspendieron de nuevo en 50 μ l de mezcla maestra de anticuerpos más tampón BD Perm/Wash y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 200 μ l de tampón BD Perm/Wash, se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 g y el sobrenadante se descartó. Finalmente, las células se suspendieron de nuevo en 200 μ l de tampón de

tinción y se realizó un análisis de citometría de flujo. Antes de la adquisición, se tiñeron las eBeads UltraComp (Invitrogen) con cada fluoróforo de anticuerpo para configurar los controles de compensación de fluorescencia adecuados. Los resultados se analizaron usando BD FACSymphony A5 y el software BD FACSDiva. El análisis se realizó usando el software FlowJo.

5 **Tabla 19. Anticuerpos para la activación de NK y análisis de la muerte de células de MM**

	Anticuerpos	Proveedor	Referencia	Comentarios
	Anti CD3-PB humano	BD Biosciences	625565	Clon SP34-2, dilución 1/100
10	Anti CD56-BUV737 humano	BD Biosciences	612767	Clon NCAM16.2, dilución 1/200
	Anti CD107a(LAMP-1)-APC humano	Miltenyi	130-119-869	Clon H4A3, dilución 1/100
15	Anti CD69-BV650 humano	Biolegend	310934	Clon FN50, dilución 1/100
	Anti CD138-PerCP-eF710 humano	ThermoFisher	46-1388-41	Clon MI15, dilución 1/50
20	Anti CD38-BUV395 humano	BD Biosciences	563811	Clon HB7, dilución 1/50
	Anti MIP1 β -PE humano	BD Biosciences	550078	Clon D21-1351, dilución 1/80
	Anti IFN γ -AF488 humano	Biolegend	502515	Clon 4S.B3, dilución 1/20

Resultados

En primer lugar se analizó la muerte de células de MM Karpas 620 inducida por NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB midiendo la pérdida de expresión de CD138 mediante citometría de flujo. NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB demostró la inducción de la muerte de células de MM Karpas 620 cuando se cocultivaron con 10 de 13 PBMC de pacientes con MM, independientemente del estadio de la enfermedad. Como era de esperar, el control de isotipo no induce la muerte de células de MM. Curiosamente, la muerte de células de MM inducida por NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a razón de 10 mg/ml fue significativa ($p = 0.0105$, **figura 33A**).

En paralelo, se evaluó la capacidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para inducir la activación de linfocitos NK mediante la medición de la expresión de IFN γ y CD107a en linfocitos NK^{dim} (**figura 33B** y **figura 33C**). La expresión de IFN γ y CD107a se induce de forma más específica en respuesta a NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB que en el control de isotipo.

En conjunto, estos resultados indican que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB tiene potencial terapéutico para el tratamiento de pacientes con MM primario o resistente al tratamiento.

Ejemplo 16. Actividad funcional ex vivo de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en muestras de pacientes con MM

Este ejemplo evalúa la capacidad de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB para inducir la muerte de células de MM usando muestras primarias de pacientes con MM. La muerte celular se determinó mediante la disminución de células de MM CD138⁺.

Materiales y métodos

(1) *Purificación celular y condiciones de cocultivo.* El día del ensayo de la muerte de células de MM, se aislaron células mononucleares de médula ósea (BMMC) de pacientes con MM mediante centrifugación de densidad en gradiente usando Ficoll-Hypaque y se tiñeron inmediatamente con un anticuerpo monoclonal anti CD138-PE y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células de MM (células CD138⁺). Las BMMC o PBMC se incubaron en presencia de un control negativo o SAR445514 o daratumumab durante 18 horas.

(2) *Preparación de células y condiciones del grupo de tratamiento y control.* Se sembraron 400,000 BMMC en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U en RPMI que contenía FCS al 5 % y 3 ng/ml de IL-6 humana recombinante. Se mantuvieron 600,000 PBMC en la incubadora para la fenotipificación mínima (CD56, CD3, CD16, NKp46) de los linfocitos NK de los pacientes y para determinar la expresión de BCMA en las células de MM. Las condiciones de control fueron las siguientes: Los controles negativos fueron BMMC o PBMC sin tratamiento añadido. Los grupos de tratamiento fueron el control de isotipo (10 µg/ml), NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (10 µg/ml) añadido a las muestras durante 18 horas a 37 ± 1 °C y CO₂ al 5 ± 1 %. Antes de la adición del tratamiento, los anticuerpos se centrifugaron a 16000 x g durante 10 minutos a +4 °C para eliminar posibles agregados.

(3) *Tinción y análisis de citometría de flujo.* Después de 18 horas de incubación conjunta a 37 ± 1 °C y CO₂ al 5 ± 1 %, las células se tiñeron extracelularmente para el análisis de citometría de flujo. (3a) Las células se transfirieron a una placa con fondo en V y se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 x g. El sobrenadante se descartó, y las células se lavaron con 200 µl de PBS y se centrifugaron de nuevo durante 1 minuto a 1900 x g. El sobrenadante se descartó. A cada muestra se le añadieron 50 µl de tampón de tinción BD pharmingen BSA/tampón de tinción Brilliant más mezcla maestra de anticuerpos y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad. Las células se lavaron con 200 µl de tampón de tinción BD Pharmingen BSA, se centrifugaron durante 1 minuto a 1900 g y el sobrenadante se descartó. Esto se repitió una segunda vez. Las células se suspendieron de nuevo en 50 µl de paraformaldehído al 1 % en PBS y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron una vez en 200 µl de tampón de tinción BSA de BD Pharmingen y se suspendieron de nuevo en 200 µl de tampón de tinción BD Pharmingen BSA para realizar el análisis de citometría de flujo,

Antes de la adquisición de muestras, se tiñeron las eBeads UltraComp (Invitrogen) con cada fluoróforo de anticuerpo para configurar los controles de compensación de fluorescencia adecuados. Las muestras y las eBeads se adquirieron usando un BD FACSymphony A5 con el software BD FACSDiva. El análisis se realizó usando el software FlowJo.

La activación de linfocitos NK se evaluó mediante la expresión de CD16, CD107a y CD69 en los linfocitos NK CD3-/CD56^{dim}. La muerte de las células de mieloma se evaluó mediante la desaparición de las células CD138⁺.

Tabla 20. Anticuerpos para la fenotipificación de NK.

5	Anticuerpos	Proveedor	Referencia	Comentarios	Número de lote
	Anti CD3-PB humano	BD Biosciences	625565	Clon SP34-2, dilución 1/100	1050279
	Anti CD56-APC humano	Miltenyi	130-113-310	Clon REA196, dilución 1/50	5211004411
10	Anti CD16-BUV395 humano	BD Biosciences	563785	Clon 3G8, dilución 1/40	1228896
	Anti NKp46-PE humano	BD Biosciences	557991	Clon 9E2, dilución 1/10	1209394
15	Anti IgG1-PE humano	BD Biosciences	555749	Clon MOPC-21, dilución 1/10	1174457

Tabla 21. Anticuerpos usados para la activación de linfocitos NK y la muerte de células de mieloma.

20	Anticuerpos	Proveedor	Referencia	Comentarios	Número de lote
	Anti CD3-PB humano	BD Biosciences	625565	Clon SP34-2, dilución 1/100	1050279
	Anti CD56-BUV737 humano	BD Biosciences	612767	Clon NCAM16.2, dilución 1/200	2047937
	Anti CD16-BUV615 humano	BD Biosciences	751572	Clon 3G8, 1/100	2042713
	Anti CD107a(LAMP-1)-APC humano	Miltenyi	130-119-869	Clon H4A3, dilución 1/100	52204024 81 - 52205099 46
	Anti CD69-BV650 humano	Biolegend	310934	Clon FN50, dilución 1/100	B356230
	Anti CD138-PerCP-eF710 humano	ThermoFisher	46-1388-41	Clon MI15, dilución 1/50	2403185
	Anti CD38-BUV395 humano	BD Biosciences	563811	Clon HB7, dilución 1/50	2004473

Tabla 22. Anticuerpos usados para la caracterización de células de mieloma múltiple.

Anticuerpos	Proveedor	Referencia	Comentarios	Número de lote
-------------	-----------	------------	-------------	----------------

Anti CD138-PerCP-eF710 humano	ThermoFisher	46-1388-41	Clon MI15, dilución 1/50	2403185
Anti CD38-BUV395 humano	BD Biosciences	563811	Clon HB7, dilución 1/50	2004473
BCMA-PE-Dazzle594	Biolegend	357511	Clon 19F2, dilución 1/25	B357269
mIgG2aPE-Dazzle594	Biolegend	400276	Clon MOPC-173, dilución 1/25	B346418

Resultados

Se estudió la actividad *ex vivo* de NKp46-BCMA en muestras de pacientes con MM (N = 16). Para ello, las BMMC o PBMC de pacientes con mieloma múltiple no se trataron, se trataron con 10 mg/ml de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB o se trataron con 10 µg/ml de control de isotipo durante 18 horas. La muerte de células de MM se midió mediante la pérdida de expresión de CD138 usando citometría de flujo. La **figura 16A-16C** representa los resultados que comparan el tratamiento *ex vivo* con NKp46=BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE en muestras de pacientes sin tratamiento previo frente a los que habían recibido terapias de referencia previas o que se incluyeron en ensayos clínicos. Las muestras de pacientes respondieron mejor al tratamiento con NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB si no habían recibido tratamiento con daratumumab (**figura 16A**) y tuvieron una probabilidad ligeramente menor de responder si el paciente tuvo múltiples rondas de recidiva (**figura 16B**). La **figura 16C** ilustra que las muestras respondieron menos a NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB después de una recaída >4 TC.

Estos datos demuestran que NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB NKCE induce la muerte de células de MM en muestras de pacientes con MM en diferentes estadios de la enfermedad (diagnóstico o recidiva).

Ejemplo 17. Estudio combinado de farmacocinética (PK) y seguridad después de la administración subcutánea repetida en macacos cangrejeros

Métodos y materiales

Se proporcionó una solución madre de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a una concentración de 50 mg/ml en histidina 10 mM, pH 5.5, sacarosa al 8 %, PS80 al 0.05 % y EDTA 10 µM.

Niveles de dosis y administración: Se administró NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB por vía subcutánea (SC, área dorsal) a macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) de ambos sexos (machos y hembras) a razón de 1 ml/kg una vez a la semana (los días 1, 8 y 15) durante tres semanas.

Tabla 23. Niveles de dosis e identificación de los animales por grupo.

Pauta posológica y vía	Nivel de dosis (µg/kg/adm.)	Concentración (µg/ml)	Volumen de dosis (ml/kg)	Id. del animal	
				Macho	Hembra
Dosis repetida SC	25 000	25 000	1	22-23	-
Dosis repetida SC	50 000	50 000	1	-	24-25

Muestras recogidas: Se recogió plasma para determinar la farmacocinética (PK) y para la evaluación de citocinas.

Muestras de PK: Se recogieron muestras de plasma para los datos de PK: El día 1 a las 1, 5 y 24 horas; el día 8 a las 0 y 24 horas; y el día 15 a las 0, 1, 5, 24 y 144 horas.

- 5 **Evaluación de citocinas (INF-g, IL-6, IL-8 y TNF-a):** Los puntos temporales de muestreo fueron antes del tratamiento, 5 y 24 horas después de cada dosificación (los días 1, 8 y 15). El sitio de muestreo fue de la vena femoral, safena y/o cefálica. Las muestras de sangre (0.5 ml) se extrajeron en un tubo de muestreo con K2-EDTA. La determinación de INF-g, IL-6, IL-8 y TNF-a en muestras de plasma de mono se realizó usando un método exploratorio de ECLIA (inmunoensayo electroquimioluminiscente) de Mesoscale Discovery (kit de ensayo U-PLEX Proinflam Combo 1 (NHP) SECTOR, n.º de catálogo K15070K-2). Todas las variaciones se expresan en comparación con los valores iniciales (antes de la primera dosificación el día 1). Debido a la variabilidad analítica, los aumentos de citocinas se consideraron biológicamente significativos cuando los valores fueron más de 2 veces superiores al valor inicial correspondiente. La clasificación se aplicó de la siguiente manera: Factor de cambio ≤ 2 : Sin cambios
- 10 biológicamente relevantes; factor de cambio de 3 a 10: Aumento muy mínimo; factor de cambio de 11 a 100: Aumento mínimo; factor de cambio de 101 a 1000: Aumento moderado; y, factor de cambio ≥ 1001 : Aumento marcado.

Resultados

- 20 Las concentraciones plasmáticas de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB se determinaron usando un método de inmunoensayo exploratorio ejecutado en la plataforma Gyrolab. Las estadísticas descriptivas (media y % de CV) de los parámetros PK de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en plasma después de cada dosificación SC semanal de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a macacos cangrejeros se presentan en la Tabla 24. Los parámetros PK individuales de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB se presentan en la Tabla 25. Los valores de concentración plasmática individual (y media) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB se presentan en la Tabla 26.

Tabla 24. Media y % de CV de los parámetros PK de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en plasma después de 3 administraciones SC semanales (n = 2 animales/dosis) de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a monos macho y hembra.

Vía y pauta posológica	Dosis (µg/kg/ad m.)	Día	Sexo		C _{máx} (ug/ml)	t _{máx} (día)	AUC _{último} (día*ug/ml)	t _{último} (día)	AUC _{0-7d} (día*ug/ml)	AUC _{0-35d} (día*ug/ml)
Repetida SC	25 000	1	M	Media	182	1	1070	7	1070	NA
		8	M	Media	301	1	1730	7	1730	NA
		15	M	Media	391	1	2100	7	2100	NA
	50 000	1	H	Media	279	7	1710	7	1710	NA
		8	H	Media	498	1	3200	7	3200	NA
		15	H	Media	743	1	4450	7	4450	NA

Vía y pauta posológi ca	Dosis (µg/kg/ad m.)	Día	Sex o	C _{máx} (ug/ml)	t _{máx} (día)	AUC _{último} (día*ug/m l)	t _{último} (día)	AUC _{0-7d} (día*ug/ml)	AUC _{0-35d} (día*ug/ml)
----------------------------------	---------------------------	-----	----------	---------------------------------	---------------------------	--	------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------

Abreviaturas: AUC: área bajo la curva de concentración frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo 0 hasta el infinito; AUC_{0-xd}: área bajo la curva de concentración frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo 0 hasta x días; AUC_{último}: área bajo la curva de concentración frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo 0 hasta el tiempo real t_{último}; C_{máx}: concentración máxima observada; CV: coeficiente de variación; H: hembra; M: macho; NA: no aplicable; SC: subcutánea; t_{último}: tiempo de la última concentración medible

Valores medios solo a 25 000 y 50 000 µg/kg/adm. como n = 2 animales/dosis

AUC_{0-7d} corresponde a la exposición a NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB no afectada por la presencia de ADA el día 1

Después de 3 administraciones SC semanales, se observó una ligera acumulación de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en el plasma los días 8 y 15, con intervalos de acumulación que variaron de 1.6 a 2.6 a razón de 25,000 y 50,000 µg/kg/adm. (es decir, 25 y 50 mg/kg/adm.), respectivamente (**figura 34A** y **figura 34B**).

En general, después de la administración SC de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a monos, la biodisponibilidad fue cercana al 90 %.

Tabla 25. Parámetros PK individuales y medios de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB en plasma observados los días 1, 8 y 15 después de 3 administraciones SC semanales de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a razón de 25,000 y 50,000 µg/kg/adm. a monos macho y hembra.

Vía	Dosis (µg/kg/adm.)	Día	Sexo	Id. del animal	C _{máx} (ug/ml)	t _{máx} (día)	AUC _{último} (día*ug/ml)	t _{último} (día)	AUC _{0-7d} (día*ug/ml)
SC	25 000	1	M	22	173	1	1030	7	1030
				23	190	1	1110	7	1110
				Media	182	1	1070	7	1070
SC	25 000	8	M	22	308	1	1770	7	1770
				23	294	1	1700	7	1700
				Media	301	1	1730	7	1730
SC	25 000	15	M	22	372	1	1890	7	1890
				23	409	1	2300	7	2300
				Media	391	1	2100	7	2100
SC	50 000	1	H	24	285	7	1640	7	1640
				25	273	7	1780	7	1780
				Media	279	7	1710	7	1710
SC	50 000	8	H	24	517	1	3380	7	3380

Vía	Dosis (µg/kg/adm.)	Día	Sexo	Id. del animal	C _{máx} (ug/ml)	t _{máx} (día)	AUC _{último} (día*ug/ml)	t _{último} (día)	AUC _{0-7d} (día*ug/ml)
5	SC	15	H	25	479	1	3020	7	3020
				Media	498	1	3200	7	3200
				24	768	1	4620	7	4620
				25	718	1	4280	7	4280
				Media	743	1	4450	7	4450

Abreviaturas: AUC_{0-xd}: área bajo la curva de concentración frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo 0 hasta x días; AUC_{último}: área bajo la curva de concentración frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo 0 hasta el tiempo real t_{último}; C_{máx}: concentración máxima observada; H: hembra; M: macho; SC: subcutánea; t_{último}: Tiempo de la última concentración medible; t_{máx}: Tiempo de la concentración máxima observada

Mediana para t_{máx} y t_{último}

Tabla 26. Valores de concentración plasmática individual y media de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB (µg/ml) observados los días 1, 8 y 15 después de 3 administraciones SC semanales de NKp46-BCMA_Fc-ADE-DSB a razón de 25,000 y 50,000 µg/kg/adm. a monos macho y hembra.

Vía	Dosis (ug/kg/adm.)	Día	Sexo	Id. del animal	Tiempo después del inicio de la dosificación (día)					
					Predosis	0.04	0.21	1	6	7
					Concentraciones plasmáticas (ug/ml)					
SC	25 000	1	M	22	-	8.82	75.5	173	-	136 ^a
				23	-	9.20	85.0	190	-	141 ^a
				Media	NA	9.01	80.3	182	NA	139 ^a
SC	25 000	8	M	22	136	-	-	308	-	208 ^b
				23	141	-	-	294	-	199 ^b
				Media	139	NA	NA	301	NA	204 ^b
SC	25 000	15	M	22	208	230	291	372	180	208 ^c
				23	199	240	297	409	282	199 ^c
				Media	204	235	294	391	231	204 ^c
SC	50 000	1	H	24	-	5.02	58.9	222	-	285 ^a
				25	-	14.1	127	265	-	273 ^a
				Media	NA	9.56	93.0	244	NA	279 ^a
SC	50 000	8	H	24	285	-	-	517	-	477 ^b
				25	273	-	-	479	-	403 ^b
				Media	279	NA	NA	498	NA	440 ^b
SC	50 000	15	H	24	477	453	558	768	612	477 ^c

Vía	Dosis (ug/kg/adm.)	Día	Sexo	Id. del animal	Tiempo después del inicio de la dosificación (día)					
					Predosis	0.04	0.21	1	6	7
					Concentraciones plasmáticas (ug/ml)					
5				25	403	463	572	718	555	403 ^c
				Media	440	458	565	743	584	440 ^c

Abreviaturas: H: hembra; M: macho; NA: no aplicable; SC: subcutánea

-: Muestra no programada

10 a Valores de concentración duplicados obtenidos en el punto temporal previo a la dosis el día 8 antes de la 2.^a inyección

b Valores de concentración duplicados obtenidos en el punto temporal previo a la dosis el día 15 antes de la 3.^a inyección

15 c Valores de concentración duplicados obtenidos en el punto temporal previo a la dosis el día 15 antes de la 3.^a inyección (suponiendo un estado estable)

20 **Evaluación de citocinas (INF-g, IL-6, IL-8 y TNF-a):** Las citocinas (INF-g, IL-6, IL-8 y TNF-a) se midieron en muestras de plasma tomadas en los puntos temporales especificados en la sección Métodos y materiales. Después de la dosificación SC semanal, no se observaron cambios en los niveles de IFN-g y TNF-a en ningún animal. En el caso de IL-6 (**figura 35**), solo se observaron aumentos transitorios y muy mínimos (factor de cambio de hasta 10 en la hembra n.º 25) a mínimos (factor de cambio de hasta 21 en la hembra n.º 24) después de la dosis más alta ensayada de 50 mg/kg/adm. En el caso de IL-8, se observaron aumentos muy mínimos (factor de cambio de hasta 6) en ambos animales a los que se les administró 25 mg/kg/adm.).

Ejemplo 18. Estudio de las proteínas de unión a NKp46-BCMA NKCE en pacientes con mieloma múltiple

Este es el primer estudio de fase 1/fase 2 en seres humanos para evaluar el NKp46-BCMA NKCE como se divulga en el presente documento en participantes con mieloma múltiple recidivante/resistente al tratamiento (MM r/r).

El estudio comprenderá tres partes. En primer lugar, una fase de aumento de la dosis en participantes con MM r/r que evaluará varias dosis administradas para determinar dos dosis que se ensayarán en la parte de optimización de la dosis. En segundo lugar, una fase de optimización de dosis que evaluará dos dosis determinadas a partir de la fase de aumento de dosis para determinar la dosis recomendada de la fase 2 preliminar (pRP2D) y la pauta para el NKp46-BCMA NKCE. En tercer lugar, una fase de expansión de dosis que evaluará la eficacia preliminar de la dosis recomendada de la fase 2 confirmada (cRP2D) y la pauta para el NKp46-BCMA NKCE en pacientes con MM r/r.

Los participantes se incluirán y se tratarán según la intervención del estudio y se separarán de la siguiente manera: aproximadamente 18-30 participantes en la primera parte/fase de aumento de dosis; aproximadamente 30 participantes en la segunda parte/fase de optimización de dosis; y aproximadamente 15 participantes en la tercera parte/expansión de dosis.

La duración del estudio para un participante incluirá un período de selección de hasta 28 días antes del día 1 del ciclo 1 (C1D1), un período de tratamiento donde los participantes incluidos recibirán la administración de ciclos de 4 semanas de NKp46-BCMA NKCE por vía subcutánea. La visita de finalización del tratamiento se realizará 30 días (+/-7 días) después de la última administración del medicamento en investigación o del inicio previo de una terapia adicional, lo que ocurra primero.

Mediciones de resultado primarias:

- Aumento de la dosis: Presencia de toxicidades limitantes de la dosis (DLT, por sus siglas en inglés). Las DLT se definirán usando los criterios NCI CTCAE versión 5.0 o los criterios ASTCT para CRS o ICANS.

- Optimización de la dosis: Tasa de respuesta global (ORR, por sus siglas en inglés). La ORR se define como la proporción de participantes con respuesta completa rigurosa (sCR), respuesta completa (CR), respuesta parcial muy buena (VGPR) y respuesta parcial (PR) de acuerdo con los criterios del International Myeloma Working Group (IMWG) de 2016, después de que el último participante haya sido tratado durante al menos 4 ciclos o haya interrumpido prematuramente el tratamiento.

- Expansión de la dosis: Tasa de respuesta global (ORR). La ORR se define como la proporción de participantes con respuesta completa rigurosa (sCR), respuesta completa (CR), respuesta parcial muy buena (VGPR) y respuesta parcial (PR) de acuerdo con los criterios del International Myeloma Working Group (IMWG) de 2016.

Mediciones de resultado secundarias:

- Tasa de respuesta global (ORR) tras aumento de la dosis: ORR definida como la proporción de participantes con sCR, CR, VGPR y PR de acuerdo con los criterios del IMWG de 2016.

- Optimización de la dosis: Presencia de DLT y porcentaje de participantes que experimentan acontecimientos adversos derivados del tratamiento (AADT). Los AADT se definen como acontecimientos adversos que se desarrollan, empeoran o se vuelven graves durante el período de tratamiento. El período de tratamiento se define como el tiempo transcurrido desde la primera dosis del tratamiento del estudio hasta 30 días después de la última dosis del tratamiento del estudio.

- Optimización y expansión de la dosis:
 - o Respuesta parcial muy buena o mejor tasa
 - o Duración de la respuesta (DOR, por sus siglas en inglés). La DOR se define como el tiempo transcurrido desde la fecha de la primera respuesta hasta la fecha de la primera aparición de enfermedad progresiva (PD, determinada por el investigador, o muerte por cualquier causa, lo que ocurra primero). La DOR se determina solo para los participantes que han logrado una respuesta (PR o mejor).

- o Tiempo hasta la primera respuesta (TT1R, por sus siglas en inglés): TT1R se define como el tiempo transcurrido desde la fecha de la primera respuesta hasta la fecha de la primera aparición de enfermedad progresiva (PD, determinada por el investigador, o muerte por cualquier causa, lo que ocurra primero). La DOR se determina solo para los participantes que han logrado una respuesta (PR o mejor).

o Tiempo hasta la mejor respuesta (TTBR, por sus siglas en inglés): TTBR se define como el tiempo transcurrido desde la primera administración del IMP hasta la fecha de la primera aparición de la mejor respuesta global (PR o mejor) que se confirme posteriormente.

o Supervivencia sin progresión (PFS, por sus siglas en inglés): La PFS se define como el tiempo desde la fecha de la primera administración del IMP hasta la fecha de la primera documentación de la enfermedad progresiva o la fecha de la muerte por cualquier causa, lo que ocurra primero. Las respuestas se determinarán de acuerdo con los criterios del IMWG. La progresión basada en paraproteína se confirmará en función de dos evaluaciones consecutivas.

o Supervivencia global (OS, por sus siglas en inglés): La OS se define como el tiempo desde la fecha de la primera administración del IMP hasta la muerte por cualquier causa.

o Tasa de beneficio clínico (CBR, por sus siglas en inglés): La CBR es la tasa de participantes con RC o RP confirmada en cualquier momento o enfermedad estable (SD) de al menos 6 meses desde la primera administración del IMP determinada por el investigador según los criterios del IMWG de 2016.

o Porcentaje de participantes que experimentan acontecimientos adversos derivados del tratamiento (AADT): Los acontecimientos adversos (AA) derivados del tratamiento se definen como AA que se desarrollan, empeoran o se vuelven graves durante el período de tratamiento. El período de tratamiento se define como el tiempo transcurrido desde la primera dosis del tratamiento del estudio hasta 30 días después de la última dosis del tratamiento del estudio.

o Tasa de incidencia de reacciones asociadas a la infusión (IAR, por sus siglas en inglés)

o Tasa de incidencia de reacciones en el lugar de la inyección (ISR, por sus siglas en inglés)

o Incidencia de anomalías de laboratorio

o Evaluación de parámetros farmacocinéticos (PK) de NKp46-BCMA NKCE en monoterapia

AUC_{último}: Área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo calculada usando el método trapezoidal desde el tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración observada por encima del límite inferior de cuantificación (es decir, C_{última})

o Evaluación de parámetros farmacocinéticos (PK) de NKp46-BCMA NKCE en monoterapia: C_{máx} (concentración máxima observada)

o Evaluación de parámetros farmacocinéticos (PK) de SAR445514 en monoterapia: T_{máx} (primera vez hasta alcanzar la C_{máx})

o Incidencia de anticuerpos antifármaco (ADA) contra NKp46-BCMA NKCE en monoterapia

o Tasa de negatividad de enfermedad residual mínima (MRD, por sus siglas en inglés): Estado de MRD en pacientes con respuesta de VGPR o mejor

Criterios de inclusión:

- Los participantes deben tener:

- o Un diagnóstico documentado de mieloma múltiple

- o Mieloma múltiple recidivante/resistente al tratamiento (MM r/r)

- o Enfermedad medible para MM r/r

o Los participantes con MM deben haber recibido al menos 2 líneas de terapia anteriores que deben incluir al menos 2 ciclos consecutivos de un inmunomodulador de segunda o tercera generación, esteroide, inhibidor del proteasoma y anticuerpo monoclonal anti CD38

o Deben tener evidencia documentada de enfermedad progresiva (PD), según los criterios del IMWG de 2016

o Para el aumento de la dosis, peso corporal de entre 40 y 120 kg

o Ser capaces de dar el consentimiento informado firmado

Criterios de exclusión:

• MM resistente al tratamiento primario definido como participantes que nunca lograron al menos una respuesta mínima con ningún tratamiento durante el curso de la enfermedad

• Segunda neoplasia maligna primaria

• LCA sistémica primaria y leucemia de células plasmáticas

• Insuficiencia cardíaca congestiva

• Infección no controlada dentro de los 14 días previos al tratamiento del estudio

• Enfermedad conocida relacionada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o enfermedad conocida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que requiera tratamiento antivírico o hepatitis A activa (definida como antígeno de hepatitis A positivo o IgM positiva); se realizará una prueba serológica del VIH en la selección para los participantes en países donde lo exijan las regulaciones locales

• Infección activa o no controlada por el virus de la hepatitis B (VHB): Participantes con antígeno de superficie B (HBsAg) positivo y/o ácido desoxirribonucleico (ADN) del VHB

• Infección activa por el virus de la hepatitis C (VHC): Ácido ribonucleico (ARN) del VHC positivo y anti VHC negativo

• Cualquier tratamiento farmacológico anti MM dentro de los 14 días anteriores al tratamiento del estudio

• Trasplante alogénico previo de células madre hematopoyéticas (HSC) con enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD, por sus siglas en inglés) activa (GvHD de cualquier grado y/o estar bajo tratamiento inmunosupresor en los últimos 2 meses antes de la asignación al azar)

• Cualquier procedimiento importante en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio

• Administración de un anticuerpo monoclonal anti CD38 (isatuximab o daratumumab) menos de 90 días antes de la primera administración del tratamiento del estudio

• Administración de un agente anti BCMA (incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T con CAR, TCE, conjugado anticuerpo-fármaco) menos de 21 días antes de la administración del tratamiento del estudio

• Toxicidades no resueltas de terapias antineoplásicas anteriores, definidas como no resueltas con respecto al Grado 1 según CTCAE Versión 5.0.

• Participantes con una contraindicación para la dexametasona

- Aquellos que recibieron cualquier otro fármaco en investigación o terapia prohibida para este estudio en los 28 días o 5 semividas desde el tratamiento del estudio, lo que sea más corto
- Hemoglobina <8 g/dl (5.0 mmol/l)
- Plaquetas $<50 \times 10^9/l$ (no se permite transfundir a un participante en el plazo de 1 semana antes del recuento de plaquetas de detección para alcanzar este nivel)
- Recuento absoluto de neutrófilos (ANC, por sus siglas en inglés) $<1000 \mu l$ ($1 \times 10^9/l$)
- Aclaramiento de creatinina <30 ml/min (fórmula de modificación de la dieta en enfermedad renal)
- Bilirrubina total >1.5 x límite superior de lo normal (ULN, por sus siglas en inglés) (a menos que el sujeto tenga síndrome de Gilbert documentado, en cuyo caso la bilirrubina directa no debe ser >2.5 x ULN)
- Aspartato aminotransferasa (AST/SGOT) o Alanina aminotransferasa (ALT/SGPT) >2.5 x ULN
- Los pacientes con hipercalcemia de grado 3 o 4 (calcio sérico corregido de >12.5 mg/dl; >3.1 mmol/l; calcio ionizado >1.6 mmol/l; o que requieran hospitalización) no serán aptos a menos que los pacientes se recuperen al grado 2 o menos con tratamiento antihipercalcémico.
- Personas alojadas en una institución debido a una orden reguladora o legal; prisioneros o participantes que estén institucionalizados legalmente
- Participante no apto para participar, cualquiera sea el motivo, a juicio del investigador
- Sensibilidad a cualquiera de las intervenciones del estudio, o componentes de las mismas, o alergia a fármacos u otras alergias que, en opinión del investigador, contraindican la participación en el estudio

Ejemplo 19. Estudio de las proteínas de unión a NKp46-BCMA NKCE en pacientes con amiloidosis de cadena ligera recidivante/resistente al tratamiento

Los regímenes de inmunoterapia o de quimioterapia de una sola dosis o combinados que se usan para tratar la LCA suelen ser difíciles de tolerar para el paciente y los pacientes a menudo sucumben a los efectos secundarios duraderos de los regímenes de tratamiento actuales para la LCA. Hassan y Sanchorawala (2022), Hemato, vol. 3: 38-46. ;Sidiqi & Gertz (2021), Blood Cancer Journal, vol. 11: 90.

El activador de linfocitos citolíticos naturales diseñado en el presente documento es potente, pero tiene un perfil de toxicidad favorable en otros contextos. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el activador de linfocitos citolíticos naturales también tendrá eficacia terapéutica para pacientes con LCA.

Se lleva a cabo un estudio de fase 1 sobre la seguridad, tolerabilidad y viabilidad de administrar a pacientes con amiloidosis de cadena ligera recidivante/resistente al tratamiento un NKp46-BCMA NKCE como se divulga en el presente documento. Este estudio tiene como objetivo identificar la dosis y el régimen de NKp46-BCMA NKCE que se puede administrar de forma segura a los pacientes. Los pacientes se monitorizan durante todo el estudio para determinar la toxicidad, efectos secundarios adversos y progresión de la enfermedad. Se seleccionan para este estudio pacientes con diagnóstico de amiloidosis de cadena ligera sin un diagnóstico previo de mieloma múltiple.

Descripción general del estudio:

Este es un estudio de fase 1/2, sin ocultación y pionero en seres humanos para investigar la seguridad y eficacia de un NKp46-BCMA NKCE, un activador de linfocitos NK que se dirige al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), como monoterapia en pacientes con amiloidosis de cadena ligera recidivante/resistente al tratamiento (RRLCA, por sus siglas en inglés).

Criterios de inclusión y exclusión:

Se permitirá la inclusión de pacientes que tengan un diagnóstico documentado de amiloidosis de cadena ligera y que hayan recibido al menos una línea de tratamiento previa que comprenda al menos un inhibidor del proteasoma. Los pacientes deben presentar una enfermedad medible de acuerdo con la actualización de la International Society of Amyloidosis (ISA) de 2012 y deben tener evidencia documentada de enfermedad progresiva (PD), según los criterios de la ISA de 2012. Los pacientes deben tener uno o más órganos afectados por amiloidosis según las directrices de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN).

Para los fines de aumento de dosis, el peso corporal del paciente debe estar entre 50 y 100 kg. Los pacientes también deben ser adultos mayores de 18 años y también deben ser capaces de dar su consentimiento informado firmado.

Los pacientes serán excluidos del estudio si se demuestra cualquiera de los siguientes:

1. Evidencia de afección cardiovascular clínicamente significativa, definida como una o más de las siguientes:

a. Prohormona en el extremo N del péptido natriurético cerebral (NT-proBNP) >8500 ng/ml
b. Insuficiencia cardíaca de clasificación IIb o IV de la New York Heart Association (NYHA)
c. Insuficiencia cardíaca que, en opinión del investigador, no esté relacionada principalmente con la miocardiopatía de la LCA (incluyendo, pero sin limitación, cardiopatía isquémica, vasculopatía no corregida, infecciones)

d. Acontecimiento previo (antecedentes) en los últimos 6 meses de síndrome coronario agudo, infarto de miocardio o angina inestable, así como participantes que durante los últimos 6 meses experimentaron una intervención cardíaca percutánea con endoprótesis y/o derivación de arteria coronaria

e. Hospitalización en las últimas 4 semanas previas al tratamiento relacionada con un acontecimiento cardiovascular

f. Antecedentes de arritmia y/o trastornos de la conducción cardíaca para los que se requiere un marcapasos o un desfibrilador cardioversor implantable (ICD, por sus siglas en inglés) pero no se ha colocado, incluyendo, pero sin limitación, taquicardia ventricular sostenida, asociación de una disfunción del nódulo auriculoventricular o sinoauricular

2. Una presión arterial sistólica de <100 mmHg o una presión arterial diastólica de <55 mmHg

3. Diagnóstico previo o actual de mieloma múltiple sintomático, incluida la presencia de enfermedad ósea lítica, plasmacitomas, ≥60 % de células plasmáticas en la médula ósea o hipercalcemia

4. Infección no controlada dentro de los 14 días previos al tratamiento del estudio

5. Enfermedad conocida relacionada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o enfermedad conocida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que requiera tratamiento antivírico o hepatitis A activa (definida como antígeno de hepatitis A positivo o IgM positiva); se realizará una prueba serológica del VIH en la selección para los participantes en países donde lo exijan las regulaciones locales
- 5 6. Infección activa o no controlada por el virus de la hepatitis B (VHB): Participantes con antígeno de superficie B (HBsAg) positivo y/o ácido desoxirribonucleico (ADN) del VHB
7. Infección activa por hepatitis C (VHC): Ácido ribonucleico (ARN) del VHC positivo y anti VHC negativo
8. Cualquier amiloidosis de cadena no ligera
- 10 8. Terapia previa/concomitante:
 - a. Cualquier tratamiento farmacológico anti mieloma múltiple dentro de los 14 días anteriores al tratamiento del estudio
 - b. Trasplante alogénico previo de células madre hematopoyéticas (HSC) con enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD) activa de cualquier grado y/o estar bajo tratamiento inmunosupresor en los últimos 2 meses antes de la asignación al azar
 - 15 c. Cualquier procedimiento importante en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio
 - d. Administración de un anticuerpo monoclonal anti CD38 (isatuximab o daratumumab) menos de 90 días antes de la primera administración del tratamiento del estudio
 - 20 e. Administración de un agente anti BCMA (incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T con CAR, TCE, conjugados anticuerpo-fármaco) menos de 21 días antes de la administración del tratamiento del estudio
 - f. Toxicidades no resueltas de terapias antineoplásicas anteriores, definidas como no resueltas con respecto al Grado 1 según CTCAE Versión 5.0
 - g. Participantes con una contraindicación para la dexametasona
9. Experiencia previa/simultánea en estudios clínicos
 - a. Aquellos que recibieron cualquier otro fármaco en investigación o terapia prohibida para este estudio en los 28 días o 5 semividas desde el tratamiento del estudio, lo que sea más corto
10. Evaluaciones diagnósticas
 - a. Hemoglobina de <8 g/dl (5.0 mmol/l)
 - b. Plaquetas $<50 \times 10^9/l$ (no se permite transfundir a un participante en el plazo de 1 semana antes del recuento de plaquetas de detección para alcanzar este nivel)
 - c. Recuento absoluto de neutrófilos (ANC) $<1000 \mu l$ ($1 \times 10^9/l$)
 - d. Aclaramiento de creatinina <30 ml/min (fórmula de modificación de la dieta en enfermedad renal)
 - e. Bilirrubina total >1.5 x límite superior de lo normal (ULN), a menos que el sujeto tenga síndrome de Gilbert documentado, en cuyo caso la bilirrubina directa no debe ser >2.5 x ULN)

f. Aspartato aminotransferasa (AST/SGOT) o Alanina aminotransferasa (ALT/SGPT) >2.5 x ULN

g. Los pacientes con hipercalcemia de grado 3 o 4 (calcio sérico corregido de >12.5 mg/dl; >3.1 mmol/l; calcio ionizado >1.6 mmol/l; o que requieran hospitalización) no serán aptos a menos que los pacientes se recuperen al grado 2 o menos con tratamiento antihipercalemicó

11. Otras exclusiones:

a. Personas alojadas en una institución debido a una orden reguladora o legal; prisioneros o participantes que estén institucionalizados legalmente

b. Participante no apto para participar, cualquiera sea el motivo, a juicio del investigador

c. Sensibilidad a cualquiera de las intervenciones del estudio, o componentes de las mismas, o alergia a fármacos u otras alergias que, en opinión del investigador, contraindican la participación en el estudio

Objetivos del estudio:

Los objetivos principales de este estudio son: 1) determinar la dosis recomendada de la fase 2 (RP2D) durante el aumento de la dosis; y 2) determinar la respuesta hematológica a la dosis recomendada combinada de la fase 2 durante la expansión de la dosis. La pRP2D tendrá en cuenta las toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en el ciclo 1, el perfil de seguridad global, la farmacocinética (si corresponde), y se tendrán en cuenta los biomarcadores. La respuesta hematológica se define como la proporción de participantes con respuesta completa rigurosa (sCR), respuesta completa (CR), respuesta parcial muy buena (VGPR) y respuesta parcial (PR) de acuerdo con los criterios de la European Society of Hematology/International Society of Hematology Working Group.

Los objetivos secundarios del estudio son: 1) evaluar la eficacia potencial de NKp46-BCMA NKCE en los participantes, 2) evaluar la seguridad de NKp46-BCMA NKCE en los participantes, 3) caracterizar la farmacocinética (PK) de NKp46-BCMA NKCE como monoterapia, 4) evaluar la inmunogenicidad potencial de NKp46-BCMA NKCE como monoterapia (incidencia de anticuerpos antifármaco (ADA) contra NKp46-BCMA NKCE), y 5) evaluar la tasa de negatividad de enfermedad residual mínima (MRD) de NKp46-BCMA NKCE en pacientes con una respuesta de VGPR o mejor.

Los objetivos terciarios del estudio son: 1) evaluar el impacto de la fragilidad en el resultado clínico (cuestionario de actividades de la vida diaria (AVD) y actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD)); 2) evaluar el impacto de NKp46-BCMA NKCE en las manifestaciones neurológicas en pacientes con RRLCA

Diseño del estudio:

Este es un estudio sin ocultación pionero en seres humanos (FIH, por sus siglas en inglés), para evaluar la seguridad y eficacia de NKp46-BCMA NKCE, como agente único en participantes con LCA recidivante/resistente al tratamiento (RRLCA). Una fase de aumento de la dosis en la RRLCA para evaluar dos dosis para garantizar que las dosis sean seguras. Una fase de expansión de dosis evaluará la eficacia preliminar de la dosis recomendada de la fase 2 (RP2D) y la pauta. Durante la fase de aumento de la dosis

y la fase de expansión de la dosis, NKp46-BCMA NKCE se administrará a los participantes por vía subcutánea.

El estudio incluirá:

- Un período de selección de hasta 28 días antes de comenzar el estudio;
- 5 - Un período de tratamiento durante el cual los participantes incluidos recibirán la medicación del estudio (ciclos de 4 semanas, administración subcutánea)
- Visita de finalización del tratamiento. La visita de finalización del tratamiento se realizará aproximadamente 30 días después de la última medicación del estudio o antes del inicio de la medicación adicional, lo que ocurra primero.

10 La duración del estudio para un participante incluirá:

- Un período de selección: Hasta 28 días antes del día 1 del ciclo 1 (C1D1)
- Un período de tratamiento: Los participantes incluidos recibirán la administración de ciclos de 4 semanas de NKp46-BCMA NKCE por vía subcutánea.
- El final del tratamiento tendrá lugar 30 días (+/-7 días) después de la última administración del medicamento en investigación (IMP, por sus siglas en inglés) o antes del inicio de la terapia adicional, lo que ocurra primero.
- El período de seguimiento continuará hasta la muerte, a pedido del participante de interrumpir el estudio, después del análisis final de supervivencia global o después de la cancelación del seguimiento de supervivencia a discreción del Patrocinador en cualquier momento.

20 Las consideraciones para la determinación de la dosis comprenderán (pero limitación) la DLT en el ciclo 1, el perfil de seguridad global, la PK y los biomarcadores (tal como el recuento de linfocitos NK, el marcador de activación de linfocitos NK, el BCMA soluble) y no deben superar la MTD estimada.

La expansión de la dosis comprenderá a 14 participantes tratados con la pRP2D. El criterio de valoración principal para la cohorte será la respuesta hematológica después de que el último participante sea tratado durante 4 ciclos o tras una interrupción prematura. La respuesta y progresión hematológica de la LCA, y la respuesta y progresión orgánica se evaluarán localmente usando los criterios de la ISA de 2012. Todos los participantes tratados con la cRP2D durante el aumento de la dosis y la expansión de la dosis (población expuesta) se tendrán en cuenta para el análisis de los criterios de valoración primarios y secundarios. Se actualizará el análisis de la PFS y la OS aproximadamente 15 meses después de la LPI, y la fecha límite para el análisis final de la OS será aproximadamente 30 meses después de la LPE, también realizado en la población expuesta.

Evaluación de riesgos:

En este estudio, se analizaron los siguientes riesgos potenciales importantes de NKp46-BCMA_NKCE (teniendo en cuenta la plausibilidad biológica existente y la vía de administración subcutánea): Reacciones a la infusión, síndrome de liberación de citocinas, neurotoxicidad (distinta de ICAN), hipogammaglobulinemia, agotamiento de linfocitos B e infecciones, reactivaciones víricas, riesgos en el contexto de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), reacción en el lugar de la inyección, inmunogenicidad y segundas neoplasias malignas primarias.

Criterios de valoración:

Criterios de valoración primarios:

Observaciones al final del aumento de la dosis:

5 - Presencia de toxicidades limitantes de la dosis (DLT) al final del ciclo 1 (4 semanas) y el porcentaje de participantes que experimentaron acontecimientos adversos derivados del tratamiento (AADT) observados desde el inicio hasta el final del seguimiento (aproximadamente 15 meses).

10 - Respuesta hematológica (HR, por sus siglas en inglés). La HR se define como la proporción de participantes con respuesta completa rigurosa (sCR), respuesta completa (CR), respuesta parcial muy buena (VGPR) y respuesta parcial (PR) de acuerdo con las directrices de la European Society of Hematology/International Society of Hematology Working Group entre los ciclos 1 a 4 (4 semanas por ciclo).

Criterios de valoración secundarios:

Observaciones al final del aumento de la dosis:

15 - Respuesta hematológica global (OHR, por sus siglas en inglés). La OHR se define como la proporción de participantes con CR, VGPR y PR de acuerdo con las directrices de la International Society of Amyloidosis (ISA 2012). La OHR se medirá desde el ciclo 1 hasta la primera enfermedad progresiva o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

Observaciones al final de la extensión de la dosis:

20 - Tasa de respuesta hematológica completa (HCR, por sus siglas en inglés). La HCR se define como la proporción de pacientes con respuesta completa de acuerdo con la ISA 2012. La HCR se evaluará desde el ciclo 1 hasta la primera enfermedad progresiva o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

Observaciones al final de la expansión de la dosis:

- Supervivencia global (SG). La SG se define como el tiempo desde la fecha de ingreso al estudio hasta la muerte por cualquier causa. La SG se evaluará desde el ciclo 1 hasta la muerte o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

- Supervivencia sin progresión (PFS). La PFS se define como el tiempo desde la primera administración del IMP hasta cualquiera de los siguientes: Progresión hematológica, progresión de órgano mayor (cardíaco, renal o hepático) de acuerdo con los criterios de la ISA 2012 o muerte por cualquier causa. La PFS se evaluará desde el ciclo 1 hasta la primera enfermedad progresiva (orgánica o hematológica) o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

- Tiempo hasta la primera respuesta hematológica (TT1HR, por sus siglas en inglés). La TT1HR se define como el tiempo transcurrido desde la primera administración del IMP hasta la fecha de la primera respuesta hematológica (PR o mejor) que se confirme posteriormente. La TT1HR se evaluará desde el ciclo 1 hasta la primera enfermedad progresiva o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

- Duración de la respuesta hematológica (DOHR, por sus siglas en inglés). La DOHR se define como el tiempo desde la primera administración del IMP hasta cualquiera de los siguientes: Progresión

hematológica, progresión de órgano mayor (cardíaco, renal o hepático) de acuerdo con los criterios de la ISA 2012 o muerte por cualquier causa. La DOHR se evalúa desde el ciclo 1 hasta la primera enfermedad progresiva o el final del seguimiento, lo que ocurra primero (aproximadamente 15 meses con un ciclo de 28 días).

- 5 - Porcentaje de participantes que experimentan acontecimientos adversos derivados del tratamiento (AADT). Los AADT se definen como acontecimientos adversos que se desarrollan, empeoran o se vuelven graves durante el período de tratamiento. El período de tratamiento se define como el tiempo transcurrido desde la primera dosis del tratamiento del estudio hasta 30 días después de la última dosis del tratamiento del estudio. Los AADT se evalúan desde la primera dosis del tratamiento del estudio hasta
- 10 30 días después de la última dosis del tratamiento del estudio (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

La tasa de incidencia de reacciones asociadas a la infusión (IAR) se evaluará desde el ciclo 1 hasta el final del tratamiento (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

- 15 La tasa de incidencia de reacciones en el lugar de inyección (ISR) se evaluará desde el ciclo 1 hasta el final del tratamiento (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

La incidencia de anomalías de laboratorio se evaluará desde el ciclo 1 hasta el final del tratamiento (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

La evaluación de los parámetros farmacocinéticos (PK) de NKp46-BCMA NKCE en monoterapia se evaluará desde el ciclo 1 hasta el final del tratamiento (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

- 20 La incidencia de anticuerpos antifármacos (ADA) contra NKp46-BCMA NKCE en monoterapia se evaluará desde el ciclo 1 hasta el final del tratamiento (aproximadamente 1 año con un ciclo de 28 días).

Observaciones terciarias:

- Impacto de la fragilidad en el resultado clínico del participante usando el cuestionario de actividades de la vida diaria (AVD) y actividades instrumentales de la vida diaria (AIVD).

- Tasa de respuesta a la hipotensión ortostática definida como la tasa de participantes en la cohorte con un aumento de la hipotensión ortostática de 10 mmHg en los participantes en la cohorte con hipotensión ortostática en la selección, que se define como una disminución de 20 mmHg de la presión arterial sistólica ortostática en comparación con la presión arterial sistólica en decúbito supino.

- Tasa de mejora del estado funcional en la cohorte, definida como el número de participantes con una mejora de al menos 10 en el índice de estado funcional de Karnofsky.

- Niveles de citocinas tales como interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1b (IL-1b), MIP-1b, etc.

- Perfil de células inmunitarias y perfil de células tumorales BCMA+ (aspirado de sangre y médula ósea [MO]).

- Anomalías citogenéticas (principalmente, pero sin limitación, t[4;14], t[14;16]; del[17p] y [1q21+]).

- Explorar la relación PK/farmacodinámica: Relación entre la PK de NKp46-BCMA_NKCE y biomarcadores tales como el recuento de linfocitos NK, el marcador de activación de linfocitos NK, el BMA soluble, etc.

Toxicidades limitantes de la dosis (DLT):

5 Para este estudio, las DLT se evaluarán usando los Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE), versión 5.0, del National Cancer Institute (NCI) durante el ciclo 1 (28 días) para estimar la probabilidad de dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés).

10 Para ser considerados participantes evaluables para DLT, los participantes deben completar el período de evaluación de DLT y recibir al menos el 75 % de la dosis planificada, a menos que se produzca una DLT. El período de evaluación de DLT se ha seleccionado desde la primera administración de IMP hasta el final del día 28.

Teniendo en cuenta el modo de acción y los datos previos recopilados sobre los agentes dirigidos a BCMA, los principales acontecimientos adversos derivados del tratamiento (AADT) esperados son:

Debido a la activación de los linfocitos NK: Reacciones a la infusión;

15 Debido al direccionamiento a BCMA: Citopenia (neutropenia, anemia y trombocitopenia) asociada o no con infecciones; aplasia de linfocitos B; e hipgammaglobulinemia.

Las DLT para este estudio comprenderán:

DLT hematológicas, cualquiera de los siguientes a menos que se deba a la progresión de la enfermedad o una causa obviamente no relacionada:

20 - Neutropenia de grado 4 que dure más de 7 días consecutivos
 - Neutropenia febril de grado 3 o superior (ANC $<1000/\text{mm}^3$ y una temperatura única de $>38.3^\circ\text{C}$ o una temperatura sostenida de $\geq 38.0^\circ\text{C}$) o infección neutropénica de grado 3 o superior.
 - Trombocitopenia de grado ≥ 3 asociada con hemorragia que requiera transfusión.
 - Trombocitopenia de grado 4 que dure más de 7 días consecutivos.
 - Anemia de grado 4, no explicada por la enfermedad subyacente.
 - Las transfusiones de plaquetas en ausencia de hemorragia, si no cumplen con los criterios anteriores, no se considerarán indicativas de una DLT porque la trombocitopenia es una complicación anticipada del MM y los participantes pueden ingresar al estudio con trombocitopenia preexistente.

DLT no hematológicas, cualquiera de las siguientes, a menos que se deba a la progresión de la enfermedad o a una causa obviamente no relacionada:

- Cualquier AA relacionado con el IMP no hematológico de grado ≥ 3 , excluyendo:

- Fatiga de grado 3 que dure menos de 1 semana, o
- Anomalías de laboratorio de grado 3 (excluidos los electrolitos) que mejoren al menos a grado 2 en menos de una semana (de no ser así, las de grado 4 relacionadas deben considerarse una DLT), o

- Anomalías electrolíticas aisladas de grado ≥ 3 que duren hasta 72 horas, que no sean clínicamente complicadas y se resuelvan espontáneamente o respondan a intervenciones con medicamentos convencionales, o

- Náuseas/vómitos/diarrea de grado 3 que respondan a un tratamiento médico óptimo en 48 horas, o

- Reacción asociada a la infusión de grado 3 o síndrome de liberación de citocinas que se resuelva a grado ≤ 1 o al valor inicial en 48 horas. Cualquier grado 4, independientemente de la duración, debe ser una DLT.

- Insuficiencia hepática: Cualquier elevación de grado ≥ 3 en las enzimas hepáticas (ALT o AST)

- Retraso en el inicio del ciclo 2 >14 días debido a anomalías de laboratorio relacionadas con IMP o AADT.

- Cualquier otro AA que el Investigador y el Patrocinador consideren que limita la dosis, independientemente de su gravedad, también puede considerarse como DLT.

Las intervenciones del estudio se administrarán de acuerdo con la siguiente secuencia: premedicación para NKp46-BCMA NKCE (aparte de Montelukast, 30-60 minutos antes de la administración de NKCE), a continuación NKp46-BCMA NKCE.

Los participantes recibirán el tratamiento del estudio hasta la progresión, la aparición de toxicidad inaceptable u otros criterios de interrupción permanente.

Los participantes recibirán la siguiente medicación durante al menos 4 administraciones (excepto montelukast y dexametasona/metilprednisolona) para prevenir o reducir el riesgo de posibles acontecimientos adversos. Aparte de montelukast, toda la medicación previa debe administrarse entre 15 y 50 minutos antes de la administración de NKCE.

- Montelukast (código ATC: R03DC03), 10 mg PO (a administrar solo el día 1, día 8 y día 15 del ciclo 1): 2 horas antes de la administración de NKCE.

- Dexametasona (código ATC: H02AB02), 20 mg PO administrada de 30 a 60 min antes de la administración (día 1, día 8, día 15 del ciclo 1). Como alternativa, se puede administrar metilprednisolona (código ATC: H02AB04) o equivalente en la dosis de 100 mg IV (día 1, día 8, día 15 del ciclo 1).

- Acetaminofeno (código ATC de paracetamol: N02BE01), 650 mg a 1000 mg PO o IV

- Difenhidramina, 50 mg PO (código ATC: R05AA02) o equivalente, por ejemplo, cetirizina, prometazina, dexclorfeniramina, según la disponibilidad de la aprobación, o difenhidramina, de 25 a 50 mg IV (o equivalente). Se prefiere la vía intravenosa para las primeras cuatro administraciones de NKCE.

El tocilizumab u otras intervenciones recomendadas por la institución deben estar siempre disponibles en el sitio en todo momento en caso de que un participante requiera una intervención rápida para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas grave.

Evaluaciones de la eficacia:

Los criterios de valoración primarios y secundarios se ensayarán en función del análisis de proteína M en el laboratorio central y la evaluación local de la progresión/respuesta orgánica usando los criterios de la ISA 2012.

Se realizarán pruebas de laboratorio en la selección (para determinar la elegibilidad), de nuevo en las 24 horas anteriores al inicio de la administración del tratamiento del estudio en el ciclo 1/día 1 (valor inicial para la evaluación de la respuesta) y, a continuación, el día 1 de cada ciclo durante el tratamiento hasta la progresión y para los participantes que interrumpan el tratamiento del estudio por razones distintas de la progresión, cada 4 semanas durante el seguimiento hasta la PD:

- Cuantificación de proteína M (suero y orina de 24 horas, inmunolectroforesis de proteínas e inmunofijación). Después del día 1 del ciclo 1, se realizará la inmunofijación en caso de proteína M indetectable (suero y orina).

- Niveles de cadena ligera sin suero.

- Inmunoglobulinas cuantitativas (IgG, IgA, IgM).

Aspiración de médula ósea:

Para cuantificar el porcentaje de células plasmáticas, se requiere en la selección/inicio del estudio (en los 21 días previos a la administración del tratamiento del estudio). Repetir para confirmar la CR o la sCR si se sospecha CR o sCR.

Para la evaluación de la MRD en la selección, el momento de la CR confirmada, 12 meses después del C1D1 (para pacientes con CR) y 6 meses después de la primera negatividad de MRD.

Para la evaluación citogenética: En la selección, se extraerá un aspirado de médula ósea para el análisis de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (incluyendo, pero sin limitación, del[17p], t[4;14], t[14;16], 1q21+).

Aspiración de médula ósea para el perfil genómico y genético en la selección y en el momento de la progresión.

Se debe evaluar la afectación de todos los órganos al inicio y durante el transcurso del estudio. La progresión/respuesta orgánica debe evaluarse usando los criterios de la ISA 2012.

LISTADO DE SECUENCIAS

	Nombre	Secuencia
5	HCDR1 Anti BCMA	GFTFSNFGMH (SEQ ID NO: 1)
	HCDR2 Anti BCMA	VIWSEDTNR (SEQ ID NO: 2)
	HCDR3 Anti BCMA	DQQYCSSDSCFTWFDP (SEQ ID NO: 3)
10	LCDR1 consenso Anti BCMA	CX ¹ SSTGX ² VTPX ³ X ⁴ YAN (SEQ ID NO: 4), en donde X ¹ es R o A, X ² es T o A, X ³ es S o G, y X ⁴ es N o Y
	LCDR2 consenso Anti BCMA	DNNX ⁵ X ⁶ PP (SEQ ID NO: 5), en donde X ⁵ es S, I o N y X ⁶ es R o K
15	LCDR3 consenso Anti BCMA	ALX ⁷ X ⁸ GX ⁹ QWV (SEQ ID NO: 6), en donde X ⁷ es W o Y, X ⁸ es F o Y y X ⁹ es N o G
20	LCDR1 Anti BCMA CA10 v2, v6, v7	CASSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 7)
	LCDR2 Anti BCMA CA10 v2, v6, v7	DNNSRPP (SEQ ID NO: 8)
	LCDR3 Anti BCMA CA10 v2, v6, v7	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 9)
	LCDR1 Anti BCMA CA10 v1	CRSSTGTVTPSNYAN (SEQ ID NO: 10)
	LCDR2 Anti BCMA CA10 v1	DNNSRPP (SEQ ID NO: 11)
	LCDR3 Anti BCMA CA10 v1	ALWFGNQWV (SEQ ID NO: 12)
	LCDR1 Anti BCMA CA10 v3	CASSTGAVTPSNYAN (SEQ ID NO: 13)

	Nombre	Secuencia
5	LCDR2 Anti BCMA CA10 v3	DNNIKPP (SEQ ID NO: 14)
	LCDR3 Anti BCMA CA10 v3	ALWYGGQWV (SEQ ID NO: 15)
10	LCDR1 Anti BCMA CA10 v4	CASSTGAVTPGYAN (SEQ ID NO: 16)
	LCDR2 Anti BCMA CA10 v4	DNNNKPP (SEQ ID NO: 17)
15	LCDR3 Anti BCMA CA10 v4	ALYYGGQWV (SEQ ID NO: 18)
	HCDR1 Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	GYTFSDYVIN (SEQ ID NO: 19)
20	HCDR1 (IMGT) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	GYTFSDYV (SEQ ID NO: 87)
	HCDR1 (Chothia) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	GYTFSDY (SEQ ID NO: 88)
	HCDR1 (Honegger) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	ASGYTFSDYV (SEQ ID NO: 89)
	HCDR2 Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	EIYPGSGTN (SEQ ID NO: 20)
	HCDR2 (IMGT) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	IYPGSGTN (SEQ ID NO: 90)
	HCDR2 (Chothia) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	PGSG (SEQ ID NO: 91)

	Nombre	Secuencia
5	HCDR2 (Honegger) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	IYPGSGTNYNEKFKAK (SEQ ID NO: 92)
	HCDR3 Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21)
10	HCDR3 (IMGT) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	ARRGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 93)
	HCDR3 (Chothia) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	GRYGLYAMD (SEQ ID NO: 94)
15	HCDR3 (Honegger) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	RGRYGLYAMD (SEQ ID NO: 95)
	HCDR1 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1, longitud alternativa	DYVIN (SEQ ID NO: 80)
20	HCDR2 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1 Longitud alternativa	EIYPGSGTNYNEKFKA (SEQ ID NO: 81)
	HCDR3 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1 Longitud alternativa	RGRYGLYAMDY (SEQ ID NO: 21)
	HCDR1 Anti NKp46 NKp46-2 y 13G4	SDYAWN (SEQ ID NO: 22)
	HCDR2 Anti NKp46	YITYSGSTSYNPSLES (SEQ ID NO: 23)

	Nombre	Secuencia
	NKp46-2 y 13G4	
5	HCDR3 Anti NKp46 NKp46-2 y 13G4	GGYYGSSWGVFAY (SEQ ID NO: 24)
	HCDR1 Anti NKp46 NKp46-3	EYTMH (SEQ ID NO: 25)
10	HCDR2 Anti NKp46 NKp46-3	GISPNIGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 26)
	HCDR3 Anti NKp46 NKp46-3	RGGSFDY (SEQ ID NO: 27)
15	HCDR1 Anti NKp46 NKp46-4	SFTMH (SEQ ID NO: 28)
	HCDR2 Anti NKp46 NKp46-4	YINPSSGYTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 29)
20	HCDR3 Anti NKp46 NKp46-4	GSSRGFDY (SEQ ID NO: 30)
	HCDR1 Anti NKp46 13G4	SDYAWN (SEQ ID NO: 31)
	HCDR2 Anti NKp46 13G4	YITYSGSTNYPNPSLKS (SEQ ID NO: 32)
	HCDR3 Anti NKp46 13G4	CWDYALYAMDC (SEQ ID NO: 33)
	LCDR1 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 34)
	LCDR1 (IMGT) 3D9 y NKp46-1	QDISNY (SEQ ID NO: 96)
	LCDR1 (Chothia)	SQDISNY (SEQ ID NO: 97)

	Nombre	Secuencia
	3D9 y NKp46-1	
5	LCDR1 (Honegger) 3D9 y NKp46-1	ASQDISNY (SEQ ID NO: 98)
	LCDR2 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	YTSRLHS (SEQ ID NO: 35)
10	LCDR2 (IMGT) 3D9 y NKp46-1	YTS (SEQ ID NO: 99)
	LCDR2 (Chothia) 3D9 y NKp46-1	YTS (SEQ ID NO: 100)
15	LCDR2 (Honegger) 3D9 y NKp46-1	YTSRLHSGVPSR (SEQ ID NO: 101)
	LCDR3 (Kabat) Anti NKp46 3D9 y NKp46-1	QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 36)
20	LCDR3 (IMGT) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	QQGNTRPWTF (SEQ ID NO: 102) or QQGNTRPWT (SEQ ID NO: 111)
	LCDR3 (Chothia) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	GNTRPW (SEQ ID NO: 103)
	LCDR3 (Honegger) Anti Nkp46 3D9 y NKp46-1	GNTRPW (SEQ ID NO: 104)
	LCDR1 Anti NKp46 NKp46-2	RVSENIYSYLA (SEQ ID NO: 37)
	LCDR2 Anti NKp46 NKp46-2	NAKTLAE (SEQ ID NO: 38)
	LCDR3 Anti NKp46 NKp46-2	QHHYGTPWT (SEQ ID NO: 39)
	LCDR1	RASQSISDYLH (SEQ ID NO: 40)

	Nombre	Secuencia
5	Anti NKp46 NKp46-3	
	LCDR2 Anti NKp46 NKp46-3	YASQSIG (SEQ ID NO: 41)
	LCDR3 Anti NKp46 NKp46-3	QNGHSFPLT (SEQ ID NO: 42)
10	LCDR1 Anti NKp46 NKp46-4	RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 43)
15	LCDR2 Anti NKp46 NKp46-4	AATNLAD (SEQ ID NO: 44)
	LCDR3 Anti NKp46 NKp46-4	QHFWGTPRT (SEQ ID NO: 45)
20	LCDR1 Anti NKp46 13G4	RTSENIYSYLA (SEQ ID NO: 46)
	LCDR2 Anti NKp46 13G4	NAKTLAE (SEQ ID NO: 47)
	LCDR3 Anti NKp46 13G4	QHHYDTPLT (SEQ ID NO: 48)
	VH-longitud completa Anti BCMA	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPG RGLEWVAVIWSDETNRYYADSVKGRFTVSRDNVKSTVYLQMNSL ISEDVAVYYCARDQYQCSSDSCFTWFDPWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 49)
	VL-longitud completa Anti BCMA CA10 v1	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGTVTPSNYANWVQQKPDH FFTGLIGDNNRPPGVPARFSASLIGDKAALTLSGVQPEDEAEYY CALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 50)
	VL-longitud completa Anti BCMA	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQ APRGLIGDNNRPPGTPARFSASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 51)

	Nombre	Secuencia
	CA10 v2	
5	VL-longitud completa Anti BCMA CA10 v3	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTPSNYANWVQQKPG QAPRGLIGDNNIKPPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYGGQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 52)
10	VL-longitud completa Anti BCMA CA10 v4	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTPGYANWVQQKPG QAPRGLIGDNNIKPPWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCALYYGGQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 53)
15	VL-longitud completa Anti BCMA CA10 v6	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQ FPRGLIGDNNRPPGTPARFSASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 54)
15	VL-longitud completa Anti BCMA CA10 v7	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQ AFRGLIGDNNRPPGTPARFSASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CALWFGNQWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 55)
20	VH-longitud completa Anti NKp46 3D9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSDYVINWVRQAPGQ GLEWMGEIYPGSGTNYYNEKFKAKATITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARRGRYGLYAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 56)
	VH-longitud completa Anti NKp46 NKp46-1	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQ GLEWIGEIYPGSGTNYYNEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSE DSAVYFCARRGRYGLYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 57)
	VH-longitud completa Anti NKp46 NKp46-2	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGN KLEWMGYITYSGSTSYNPSLESRISITRDTSTNQFFLQLNSVTED TATYYCARGGYGSSWGVFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 58)
	VH-longitud completa Anti NKp46 NKp46-3	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWWKQSHGKS LEWIGGISPNIGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSE DSAVYYCARRGGSFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 59)
	VH-longitud completa Anti NKp46 NKp46-4	QVQLQQSAVELARPGASVKMSCKASGYTFTSFTMHWWKQRPGQ GLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLDSLTS DDSAVYYCVRGSSRGFDYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 60)

Nombre	Secuencia
VH-longitud completa Anti NKp46 10B8	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDYAWNWIWIRQPPGK GLEWIGYITYSGSTSYNPSLESRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARGGYYGSSWGVFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 61)
VH-longitud completa Anti NKp46 12E12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSFTMHWVRQAPGQ GLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCVRGSSRGFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)
VH-longitud completa Anti NKp46 13G4	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDYAWNWIWIRQPPGK GLEWIGYITYSGSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARCWDYALYAMDCWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 63)
VL-longitud completa Anti NKp46 3D9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYFCQQ GNTRPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 64)
VL-longitud completa Anti NKp46 NKp46-1	DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVK LLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQG NTRPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 65)
VL-longitud completa Anti NKp46 NKp46-2	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRVSENIYSYLAWYQQKQKSPQ LLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQH HYGTPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 66)
VL-longitud completa Anti NKp46 NKp46-3	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLNWYQQKSHESP RLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQN GHSFPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 67)
VL-longitud completa Anti NKp46 NKp46-4	DIQMIQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWFQQKQKSPQ LLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGIYYCQH FWGTPRTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 68)
VL-longitud completa Anti NKp46 10B8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSYLAWYQQKPGKAPK LLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQH HYGTPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 69)

Nombre	Secuencia
VL-longitud completa Anti NKp46 12E12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWFQQKPGKAPK LLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQH FWGTPRTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 70)
VL-longitud completa Anti NKp46 13G4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSENIYSYLAWCQQKPGKAPK LLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHH YDTPLTFGQGKLEIK (SEQ ID NO: 71)
Cadena polipeptídica (I) (cadena ligera)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGTVTPSNYANWVQQKPGQ AFRGLIGDNNRPPGTPARFSASLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CALWFGNQWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYFCQQGNTRPWTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72)
Cadena polipeptídica (II) Cadena pesada, completa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSDYVINWVRQAPGQ GLEWMGEIYPGSGTNYINEKFKAKATITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARRGRYGLYAMDYWGQGTITVTVSSQVQLVESGGG VVQPGRSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGRGLEWVAVIWS DETNRYYADSVKGRFTVSRDNVKSTVYLQMNSLISEDVAVYYCA RDQQYCSDSCFTWFDPWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO: 73)
Cadena polipeptídica (III) (Fc solo)	DKHTCPCPCAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV

Nombre	Secuencia
5	LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSL SLSPG (SEQ ID NO: 74)
	Ck RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 75)
10	CH1-CH2-CH3 (Cadena pesada, completa) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 76)
15	CH1-CH2-CH3 (Fc solo) DKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSL SLSPG (SEQ ID NO: 77)
20	Enlazador ₁ (cadena ligera) GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 78)
	Enlazador ₂ (cadena ligera) GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 79)
	Enlazador GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 82)
	Enlazador TKGPS (SEQ ID NO: 83)
	Enlazador GQPKAAP (SEQ ID NO: 84)
	Enlazador GGS GSS GSGG (SEQ ID NO: 85)
	péptido en la molécula NKp46- BCMA NKCE_Fc CODV-OL1-ADE- DSB VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 86)
	péptido en la molécula NKp46- BCMA NKCE_Fc GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 105)

Nombre	Secuencia
CODV-OL1-ADE-DSB	
5 péptido en la molécula NKp46-BCMA NKCE_Fc CODV-OL1-ADE-DSB	TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 106)
10 Cebador	TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGTCTTCCACACTCCCTGC (SEQ ID NO: 107)
	CCGCCCCGACTCTAGATCAATGGTGATGGTGGTGATGATTCTGGCAGTGTGATCCC (SEQ ID NO: 108)
	TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGTCTTCCACACTCCGTGC (SEQ ID NO: 109)
15 Cebador	CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCATTCTGGGCAGTGTGGTCC (SEQ ID NO: 110)