

PROTEÍNA TRIESPECÍFICA DIRIGIDA A TROP2 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

REFERENCIA CRUZADA

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 63/478.640, presentada el 5 de enero de 2023, y la Solicitud Provisional de EE. UU. N.º 63/496.159, presentada el 14 de abril de 2023, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[0002] Todas las publicaciones, patentes y aplicaciones de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia en el mismo grado que si cada publicación individual, patente o solicitud de patente se hubiera indicado de forma específica e individualmente para su incorporación por referencia.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

[0003] TROP2 es una proteína que en seres humanos está codificada por el gen TACSTD2. Este antígeno es un miembro de una familia que incluye al menos dos proteínas de membrana de tipo I. Transduce una señal de calcio intracelular y actúa como receptor de superficie celular. Los estudios han demostrado que la sobreexpresión de la proteína TROP2 aberrante está asociada con diversos carcinomas, tales como colorrectal, pancreático, gástrico, carcinoma oral de células escamosas, cánceres de ovario y de mama. Los carcinomas con alta expresión de TROP2 se asocian con una mayor recurrencia de la enfermedad, resistencia a fármacos, y es un factor de mal pronóstico para la supervivencia.

[0004] Existe la necesidad de una mayor elección de opciones de tratamiento que permita a los médicos seleccionar el tratamiento con el mejor perfil de efectos secundarios para un paciente individual. La presente divulgación proporciona nuevos polipéptidos y productos terapéuticos de proteínas útiles en métodos de tratamiento, particularmente para el tratamiento de afecciones asociadas con la expresión anormal de TROP2.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

[0005] En el presente documento se proporciona un dominio de unión a TROP2 que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o

una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es parte de una proteína multiespecífica. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende un formato de fármaco activo. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio de unión a proteína de suero en masa. En algunas realizaciones, la proteína de suero en masa comprende una proteína de albúmina de suero. En algunas realizaciones, la proteína de seroalbúmina comprende una proteína de seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el dominio de unión a proteínas séricas en masa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 493 o 549. En algunas realizaciones, el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, el dominio de unión a proteínas séricas en masa es un resto de unión que comprende un enlazador y un resto de enmascaramiento, en donde el resto de enmascaramiento es capaz de enmascarar, o enmascara, la unión del dominio de unión a TROP2 o el dominio de unión a CD3, a sus respectivas dianas. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende un formato de profármaco no escindible. En algunas realizaciones, el resto de enmascaramiento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550. En algunas realizaciones, el enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

En algunas realizaciones, el dominio de unión a proteínas séricas en masa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, en donde la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, el fármaco activo comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[0006] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

[0007] En el presente documento se proporciona una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa que comprende una única cadena polipeptídica, que comprende (a) un resto de unión que comprende un bucle no de CDR y un enlazador escindible; (b) el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 en donde el resto de unión es capaz de enmascarar, o enmascara, la unión del dominio de unión a TROP2 a su diana.

[0008] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

[0009] En el presente documento se proporciona una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa que comprende un resto de unión (M) que comprende un bucle no de CDR, un enlazador escindible (L), un primer dominio de unión a antígeno diana (T1) y un segundo dominio de unión a

antígeno diana (T2), en donde al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana (T1) y el segundo dominio de unión a antígeno diana (T2) comprende en donde al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana (T1) y el segundo dominio de unión a antígeno diana (T2) comprende un dominio de unión a TROP2, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228, en donde el bucle no de CDR es capaz de unirse al dominio de unión a TROP2 o al segundo dominio de unión a antígeno diana, y en donde el resto de unión es capaz de enmascarar, o enmascara, la unión del dominio de unión a TROP2 o el segundo dominio de unión a antígeno diana a su diana. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende un resto de enmascaramiento y en donde el resto de enmascaramiento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560, o una secuencia que comprende una o más sustituciones con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, el segundo dominio de unión a antígeno diana (T2) comprende un dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 494.

[0010] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral, que comprende administrar un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo de acuerdo con las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

[0011] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar

una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica que comprende la misma, al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es humano.

[0012] En algunas realizaciones, el dominio de unión es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el dominio de unión es un anticuerpo de dominio único, un dominio VHH, un scFv, un dominio VH, un dominio VL, un Fab, un Fab', un dominio no de Ig, un ligando, una knotina o una entidad de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el dominio de unión comprende el anticuerpo de dominio único. En algunas realizaciones, el dominio de unión se une a TROP2 con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 500 nM. En algunas realizaciones, el dominio de unión se une a TROP2 humana, TROP2 de ratón, TROP2 de macaco cangrejero, o una combinación de los mismos.

[0013] En el presente documento se proporciona una proteína multiespecífica que comprende un dominio de unión a TROP2, en donde el dominio de unión a TROP2 está de acuerdo con las descripciones del presente documento. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 de acuerdo con las descripciones del presente documento (dominio anti-TROP2) y un dominio de unión a CD3 (dominio anti-CD3). En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2 y el dominio anti-CD3 están en una orientación anti-TROP2:anti-CD3. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2 y el dominio anti-CD3 están en una orientación anti-CD3:anti-TROP2. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 de acuerdo con las descripciones del presente documento (dominio anti-TROP2), el dominio de unión a CD3 (dominio anti-CD3) y un dominio de unión a albúmina (dominio anti-ALB). En algunas realizaciones, el dominio anti-CD3 comprende un aminoácido como se expone en SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, el dominio anti-ALB comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-CD3: anti-ALB: anti-TROP2. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-TROP2: anti-ALB: anti-CD3. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-ALB: anti-TROP2: anti-CD3. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-CD3:anti-TROP2:anti-ALB. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-ALB:anti-CD3:anti-TROP2. En algunas realizaciones, el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-TROP2:anti-CD3:anti-ALB.

[0014] En el presente documento se proporciona una proteína multivalente que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 229-264.

[0015] En el presente documento se proporciona un fármaco activo que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 229-264.

[0016] En el presente documento se proporciona un fármaco activo que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-57.

[0017] En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende (i)(a) un dominio de unión a TROP2 descrito en el presente documento; (i)(b) una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa descrita en el presente documento; (i)(c) una proteína multiespecífica descrita en el presente documento; (i)(d) una proteína multivalente descrita en el presente documento; o (i)(e) un fármaco activo descrito en el presente documento, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0018] En el presente documento se proporciona un proceso para producir el dominio de unión a TROP2 descrito en el presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a TROP2 en condiciones que permiten la expresión del dominio de unión a TROP2, y recuperar y purificar adicionalmente la proteína producida a partir del cultivo.

[0019] En el presente documento se proporciona un proceso para producir una proteína multiespecífica de acuerdo con las descripciones del presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína de unión a TROP2 multiespecífica de acuerdo con las descripciones del presente documento en condiciones que permitan la expresión de la proteína multiespecífica y recuperar y purificar la proteína producida a partir de la cultura.

[0020] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento, al sujeto.

[0021] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar la proteína multiespecífica de acuerdo con las descripciones del presente documento, una proteína multivalente de acuerdo con las descripciones del presente documento, un fármaco activo de acuerdo con las descripciones del presente documento o una composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento, al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es

humano. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un agente en combinación con un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con las descripciones del presente documento, una proteína multiespecífica de acuerdo con las descripciones del presente documento, una proteína multivalente de acuerdo con las descripciones del presente documento, un fármaco activo de acuerdo con las descripciones del presente documento o una composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une selectivamente a las células tumorales que expresan TROP2. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido. En algunas realizaciones, la enfermedad de tumor sólido es metastásica. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de un agente en combinación con la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con una cualquiera de las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica que comprende la misma. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une selectivamente a las células tumorales que expresan TROP2. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido. En algunas realizaciones, la enfermedad de tumor sólido es metastásica. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral es al menos una de: un cáncer colorrectal, un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

[0022] En el presente documento se proporciona un proceso para producir una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con las descripciones del presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína de

unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con las descripciones del presente documento, en condiciones que permitan la expresión de la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa y recuperar y purificar la proteína producida del cultivo.

[0023] En el presente documento se proporciona un proceso para producir una proteína multivalente de acuerdo con las descripciones del presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína multivalente de acuerdo con las descripciones del presente documento, en condiciones que permitan la expresión de la proteína multivalente y recuperar y purificar la proteína producida a partir del cultivo.

[0024] En el presente documento se proporciona un proceso para producir un fármaco activo de acuerdo con las descripciones del presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios del fármaco activo de acuerdo con las descripciones del presente documento, en condiciones que permitan la expresión del fármaco activo y recuperar y purificar el fármaco producido a partir del cultivo.

[0025] En el presente documento se proporciona una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa, en donde la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa tiene un índice terapéutico mayor en comparación con una proteína de unión a TROP2 que no comprende el resto de unión (a) pero que, por lo demás, es idéntica a la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa tiene un índice terapéutico que es al menos aproximadamente de 5 veces a aproximadamente 100 veces mayor que el de una proteína de unión a TROP2 que no comprende el resto de unión (a) pero que, por lo demás, es idéntica a la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa. En algunas realizaciones, la proteína comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, en donde la proteína comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[0026] En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende: (i) una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con las descripciones del presente documento, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0027] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar el receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo de acuerdo con las descripciones del

presente documento, o la composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento, al sujeto.

[0028] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con las descripciones del presente documento, o la composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento, al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es humano. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

[0029] En el presente documento se proporciona un método para aumentar un índice terapéutico del dominio de unión a TROP2, comprendiendo el método conjugar el dominio de unión a TROP2 a un resto de unión que comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a TROP2, en donde el dominio de unión a TROP2 está enmascarado para que no se una a su diana por el resto de unión, en donde el dominio de unión a TROP2 es capaz de unirse a su diana tras la escisión del enlazador escindible. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 conjugado con el resto de unión es parte de una proteína multiespecífica condicionalmente activa, en donde la proteína multiespecífica comprende además un dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones,

el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

[0030] En el presente documento se proporciona un método para aumentar un índice terapéutico de la proteína de unión a TROP2 que comprende un primer dominio de unión a antígeno diana y un segundo dominio de unión a antígeno diana, en donde al menos uno del primer y el segundo dominio de unión a antígeno diana comprende un dominio de unión a TROP2, comprendiendo el método conjugar el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana a un resto de unión que

comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana, en donde al menos uno del primer o segundo dominio de unión a antígeno diana está enmascarado para que no se una a su diana por el resto de unión, y en donde el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana que está enmascarado, es capaz de unirse a su diana tras la escisión del enlazador escindible. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a TROP2. En algunas realizaciones, al menos uno del primer o segundo dominio de unión a antígeno diana comprende un dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[0031] En el presente documento se proporciona un método para aumentar un índice terapéutico de una proteína de unión a TROP2 que comprende un dominio de unión a TROP2 y un dominio de unión a CD3, comprendiendo el método conjugar el dominio de unión a CD3 a un resto de unión que comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 493. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[0032] En el presente documento se proporciona una proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2, que comprende: un dominio de unión a TROP2, un dominio de unión a CD3, un dominio de unión a albúmina, en donde el dominio de unión a albúmina comprende un bucle no de CDR que comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3 y un enlazador escindible, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante

de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228. En algunas realizaciones, el dominio de unión a albúmina comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 494. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 496-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[0033] En el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de las descripciones del presente documento. En algunas realizaciones, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

[0034] En el presente documento se proporciona un proceso para producir TROP2 que se dirige a la proteína multiespecífica condicionalmente activa de las descripciones del presente documento, comprendiendo dicho proceso cultivar un huésped transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de las descripciones del presente documento, en condiciones que permitan la expresión de la proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 y recuperar y purificar la proteína producida del cultivo.

[0035] En el presente documento se proporciona un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de las descripciones del presente documento, o una composición farmacéutica de acuerdo con las descripciones del presente documento, al sujeto. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido. En algunas realizaciones, la enfermedad de tumor sólido es metastásica. En algunas realizaciones, la enfermedad tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0036] Las características novedosas de la divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en la que se utilizan los principios de la divulgación y los dibujos adjuntos de los cuales:

[0037] La **figura 1** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL3, 2TRL92, 3TRL77, 2TRL4 y 2TRL76.

[0038] La **figura 2** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL3, 2TRL92, 3TRL77, 2TRL4 y 2TRL76.

[0039] La **figura 3** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL56, 3TRL87, 2TRL33, 2TRL1 y 2TRL5.

[0040] La **figura 4** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL8, 2TRL27, 2TRL46, 2TRL69 y 2TRL94.

[0041] La **figura 5** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRL81, 2TRL18, 3TRL27, 2TRL76 y control negativo GFP.

[0042] La **figura 6** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL28, 3TRL39, 3TRL82, 2TRL68, 2TRL64 y 3TRL53.

[0043] La **figura 7** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL3, 2TRL92, 3TRL77, 2TRL4 y 2TRL76.

[0044] La **figura 8** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL16, 2TRL29, 3TRL58, 2TRL31 y 2TRL70.

[0045] La **figura 9** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL56, 3TRL87, 2TRL33, 2TRL1 y 2TRL5.

[0046] La **figura 10** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL8, 2TRL27, 2TRL46, 2TRL69 y 2TRL94.

[0047] La **figura 11** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRL81, 2TRL18, 3TRL27, 2TRL76 y control negativo GFP.

[0048] La **figura 12** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL28, 3TRL39, 3TRL82, 2TRL68, 2TRL64 y 3TRL53.

[0049] La **figura 13** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL53, 3TRH53, 2TRL76 y 2TRH76.

[0050] La **figura 14** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células H292 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRH79, 2TRL81 y 2TRH81.

[0051] La **figura 15** proporciona resultados de un ensayo de TDCC con células HT1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL53, 3TRH53, 2TRL76 y 2TRH76.

[0052] La **figura 16** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células HT1376 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRH79, 2TRL81 y 2TRH81.

[0053] La **figura 17** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células HCC70 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 3TRL53, 3TRH53, 2TRL76 y 2TRH76.

[0054] La **figura 18** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células HCC70 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRH79, 2TRL81 y 2TRH81.

[0055] La **figura 19** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células HCC70 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama anti-TROP2 2TRL79, 2TRH79, 2TRH79B y 2TRH79B L040 ProTriTAC.

[0056] La **figura 20** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células HPAF-II y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias de llama y humanizadas anti-TROP2 2TRL79, 2TRH79, 2TRH79B y 2TRH79B L040 ProTriTAC.

[0057] La **figura 21** muestra resultados de un ensayo de TDCC con células CAL27 y proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias anti-TROP2 humanizadas 2TRH79B y 2TRH79B L040 ProTriTAC.

[0058] La **figura 22** muestra los resultados de un estudio terapéutico de xenoinjerto en roedores con mezcla con células HCC70 y proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene la secuencia de llama anti-TROP2 2TRL79 ProTriTAC.

[0059] La **figura 23** muestra resultados de un estudio terapéutico de xenoinjerto en roedores con mezcla con células HCC70 y proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene la secuencia de llama anti-TROP2 2TRL79 ProTriTAC.

[0060] La **figura 24** muestra resultados de un estudio terapéutico de xenoinjerto en roedores con mezcla con células HCC70 y proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene la secuencia anti-TROP2 humanizada 2TRH79 ProTriTAC.

[0061] La **figura 25** muestra resultados de un estudio terapéutico de xenoinjerto en roedores con mezcla con células CAL27 y proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene la secuencia anti-TROP2 humanizada 2TRH79B ProTriTAC.

[0062] La **figura 26** muestra resultados de un estudio terapéutico de xenoinjerto en roedores con mezcla con células HPAF-II y proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene la secuencia anti-TROP2 humanizada 2TRH79B ProTriTAC.

[0063] La **figura 27** muestra equivalentes molares de profármaco y fármaco activo que mostraron una actividad antitumoral comparativamente potente en células HCC70.

[0064] Las **figuras 28A-28B** muestra que la proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene 2TRH79B humanizada se une con afinidad comparable a Trop2 humana (FIG. 28A) y de macaco cangrejero (cyno) (FIG. 28B) en ausencia o presencia de calcio (47-51 nM o 50 nM, respectivamente).

[0065] La **figura 29** muestra el diseño experimental del estudio de aumento de dosis/dosis máxima tolerada de un mes de duración.

[0066] La **figura 30** muestra que la proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contiene 2TRH79B humanizada muestra una farmacocinética, semivida y acumulación sistémica favorables.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

[0067] En el presente documento se describen proteínas triespecíficas que se dirigen a TROP2, composiciones farmacéuticas de las mismas, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para preparar tales proteínas de los mismos. También se proporcionan métodos de uso de proteínas triespecíficas dirigidas a TROP2 de la divulgación en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos. Las proteínas triespecíficas dirigidas a TROP2 son capaces de unirse específicamente a TROP2 así como a CD3 y tienen un dominio de extensión de semivida, tal como un dominio que se une a la albúmina humana (ALB).

Proteínas de unión a TROP2

[0068] En el presente documento se describen proteínas que se unen a TROP2, composiciones farmacéuticas de las mismas, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped para preparar tales proteínas de los mismos. También se proporcionan métodos para usar las proteínas de unión a TROP2 divulgadas en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 son parte de proteínas multiespecíficas (*por ejemplo*, triespecíficas) que comprenden un dominio de unión a TROP2 como se describe en el presente documento.

[0069] Antígeno de superficie celular trofoblástica 2 (Trop2) o transductor de señal de calcio asociado a tumor 2 (TACSTD2) o glicoproteína epitelial 1 (EGP-1), o proteína marcadora de carcinoma pancreático GA733-1, o GP50, o componente de membrana 1 marcador de superficie 1 (M1S1) es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 35 kDa ampliamente expresada con cuatro sitios de glicosilación unidos a N, que consiste en 323 aminoácidos codificados por el gen TACSTD2. Es un miembro de la familia de transductores de señal de calcio asociados a tumores (TACSTD) y está estructuralmente relacionado con la molécula de adhesión de células epiteliales

(EpCAM). Trop-2 comprende un gran dominio extracelular, un único dominio transmembrana y una cola intracelular. La estructura cristalina del ectodominio de TROP2 reveló una subunidad compacta compuesta por tres dominios: N-terminal (ND), tiroglobulina tipo 1 (TY) y dominio C-terminal (CD). Los dominios extracelulares de TROP2 pueden formar dímeros.

[0070] TROP2 comparte una capacidad de interacción de claudina similar con su parólogo EpCAM, y ambos están implicados en la señalización desencadenada por escisión proteolítica dentro del ectodominio. Trop-2 desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario, la formación de tejido placentario, la implantación de embriones, la proliferación de células madre y el desarrollo de órganos. TROP2 es un marcador de células madre/progenitoras y se encuentra un nivel de expresión basal bajo de TROP2 en la superficie de múltiples tejidos epiteliales normales, incluyendo la piel y la mucosa oral. La sobreexpresión de TROP2 se observa en muchos tipos de tumores epiteliales malignos como el cáncer gástrico, cáncer de tiroides, cáncer papilar de tiroides, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama, por ejemplo, cáncer de mama ductal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cuello de útero, cáncer papilar seroso uterino, carcinosarcomas uterinos y ováricos, cáncer de endometrio, cáncer nasofaríngeo, colangiocinoma hiliar, cáncer escamocelular oral, cáncer de células escamosas de esófago, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas de laringe, colagiocarcinoma asociado a trematodos hepáticos, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de esófago. También se encontró una alta expresión de Trop2 en tumores de origen no epitelial, como los melanomas, linfoma nasal de linfocitos NK/T, gliomas y glioblastomas, y osteosarcomas. La sobreexpresión de TROP2 también está vinculada a adenomas pituitarios. Aunque Trop2 se sobreexpresa con frecuencia durante la tumorigénesis, los análisis genéticos revelaron que las mutaciones puntuales y las variaciones del número de copias en el gen TACSTD2 son bastante raras en los tumores humanos. La sobreexpresión de TROP2 está vinculada a un mal pronóstico, para la supervivencia y la resistencia a los medicamentos.

[0071] Las secuencias de proteínas ilustrativas para TROP2 se proporcionan en UniProtKB ID NO: P09758 y RefSeq NP_002344 (SEQ ID NO: 546). En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en UniProtKB ID NO: P09758 o RefSeq NP_002344. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en

UniProtKB ID NO: Q8BGV3 o RefSeq NP_064431. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se proporciona en Refseq XP_005543292.2. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 codificada por un ácido nucleico como se proporciona en RefSeq NM_002353. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 codificada por un ácido nucleico como se proporciona en RefSeq NM_0200047. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a una proteína de TROP2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 546 o 547.

[0072] MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVN SVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHSDLD AELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKFSMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYYKKVEIKELGELRKEPSL (SEQ ID NO: 546).

[0073] HTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRALGSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVN SVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPKFSMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNRRKSGKYYKKVEIKELGELRKEPSL (SEQ ID NO: 547).

[0074] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une a un dominio extracelular de la proteína TROP2 madura. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une a un dominio transmembrana de la proteína TROP2 madura. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une a una cola intracelular de la proteína TROP2 madura.

[0075] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une a una proteína que comprende una secuencia truncada en comparación con SEQ ID NO: 546 o 547. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 se une a una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 546 o 547. En algunas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento reconocen TROP2 de longitud completa. En determinados casos, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento reconocen un epítipo dentro de TROP2, tal como, en algunos casos, las proteínas de unión a TROP2 interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de un dominio de TROP2 humana. El epítipo al que se unen los

anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (*por ejemplo*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados dentro de un dominio de TROP2. Como alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de un dominio de TROP2.

[0076] En algunas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento reconocen TROP2 de longitud completa. En determinados casos, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento reconocen un epítipo dentro de TROP2, tal como, en algunos casos, las proteínas de unión a TROP2 interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de un dominio de TROP2 humana. El epítipo al que se unen los anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (*por ejemplo*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos ubicados dentro de un dominio de TROP2. Como alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) ubicados dentro de un dominio de TROP2.

[0077] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se unen a la proteína TROP2 de longitud completa o a un fragmento de la misma, tal como fragmentos que contienen epítopos dentro de la proteína TROP2 de longitud completa, como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, el fragmento que contiene epítopos comprende fragmentos antigénicos o inmunogénicos y derivados de los mismos de la proteína TROP2. Los fragmentos que contienen epítopos, incluyendo fragmentos antigénicos o inmunogénicos, son, en algunas realizaciones, 12 aminoácidos o más, por ejemplo, 20 aminoácidos o más, 50 o 100 aminoácidos o más. Los fragmentos de TROP2, en algunas realizaciones, comprende el 95 % o más de la longitud de la proteína completa, 90 % o más, 75 % o 50 % o 25 % o 10 % o más de la longitud de la proteína completa. En algunas realizaciones, los fragmentos que contienen epítopos de TROP2 que incluyen fragmentos antigénicos o inmunogénicos son capaces de provocar una respuesta inmunitaria relevante en un paciente. Los derivados de TROP2 incluyen, en algunas realizaciones, variantes en la secuencia en la que uno o más (*por ejemplo*, 1-20, tal como 15 aminoácidos, o hasta el 20 %, tal como hasta el 10 % o el 5 % o el 1 % en número de aminoácidos basándose en la longitud total de la proteína), se han realizado inserciones o sustituciones en la secuencia de TROP2 proporcionada en SEQ ID NO: 546 o 547.

[0078] En algunas realizaciones, las sustituciones comprenden sustituciones conservativas. Sus derivados y variantes, en algunos ejemplos, tienen esencialmente la misma función biológica que la proteína de la que se derivan. Por ejemplo, derivados y variantes de TROP2 son, en algunos casos, comparablemente antigénicos o inmunogénicos a la proteína de la que se derivan, tienen la actividad de unión a ligandos, o la capacidad activa de formación de complejos de receptores, o

preferentemente ambas, de la proteína de la que se derivan, y tienen la misma distribución tisular que TROP2.

[0079] En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 se une específicamente a TROP2 con una afinidad equivalente o mejor que la de una proteína de unión a TROP2 de referencia, y la proteína de unión a TROP2 en tales realizaciones comprende una molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad, y se deriva de la molécula parental de unión a TROP2, que comprende una o más mutaciones de aminoácidos (*por ejemplo*, una mutación estabilizadora, una mutación desestabilizadora) con respecto a la molécula parental de unión a TROP2. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad tiene una estabilidad superior con respecto a los agentes desestabilizantes seleccionados, como la de una molécula parental de unión a TROP2 de referencia. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad se identifica en un proceso que comprende la selección de una o más moléculas de unión a TROP2 precandidatas derivadas de una o más moléculas parentales de unión a TROP2, expresada en una biblioteca de expresión de fagos, contra una proteína TROP2, tal como una proteína TROP2 humana. La molécula de unión a TROP2 precandidata comprende, en algunas realizaciones, sustituciones de aminoácidos en las regiones variables, las CDR, o restos marco, con respecto a una molécula parental.

[0080] Como se usa en el presente documento, "presentación en fagos" se refiere a una técnica mediante la cual los polipéptidos variantes se presentan como proteínas de fusión en al menos una porción de una proteína de cubierta en la superficie del fago, por ejemplo, fago filamentoso, partículas. Una utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que pueden seleccionarse rápida y eficazmente grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorias para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La presentación de las bibliotecas de péptidos y proteínas sobre el fago se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos para los que tienen propiedades de unión específicas. Los métodos de presentación en fagos polivalente se han utilizado para visualizar pequeños péptidos aleatorios y pequeñas proteínas a través de fusiones al gen III o al gen VIII del fago filamentoso. Véase, por ejemplo, Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), y referencias citadas en ese documento. En la presentación en fagos monovalentes, una biblioteca de proteínas o péptidos se fusiona con un gen III, o una porción del mismo, y se expresa a niveles bajos en presencia de la proteína del gen III de tipo silvestre para que las partículas de fago muestren una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de avidéz se reducen en relación con el fago polivalente, de modo que la selección se basa en la afinidad intrínseca del ligando, y se usan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones

de ADN. Véase, por ejemplo, Lowman y Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991).

[0081] En algunas realizaciones, la selección comprende usar tiempos de unión y concentraciones variables para identificar moléculas de unión a TROP2 con tasas de activación aumentadas o disminuidas, a partir de moléculas de unión a TROP2 precandidatas. En algunas realizaciones, la selección comprende el uso de tiempos de lavado variables para identificar moléculas de unión a TROP2 con tasas de apagado aumentadas o disminuidas, a partir de moléculas de TROP2 precandidatas. En algunas realizaciones, el lavado comprende usar tanto tiempos de unión variables como tiempos de lavado variables. En algunas realizaciones, se combinan una o más mutaciones estabilizadoras para aumentar la estabilidad de la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad, por ejemplo, mediante mezclado para crear una biblioteca combinatoria de segunda etapa a partir de tales mutantes y realizando una segunda ronda de selección seguida de una selección de unión.

[0082] En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad comprende una afinidad equivalente o mejor a una proteína TROP2 (tal como la proteína TROP2 humana) que la de una molécula parental de unión v , pero que tiene reactividad cruzada reducida, o en algunas realizaciones, reactividad cruzada aumentada, con sustancias seleccionadas, tales como ligandos, proteínas, antígenos o similares, distintas del epítipo de TROP2 para el que la molécula parental de unión a TROP2 es específica, o para la que está diseñada para ser específica. En referencia a esto último, una molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad, en algunas realizaciones, se ensaya con más éxito en modelos animales si la molécula de unión v madurada por afinidad se hace reaccionar tanto con TROP2 humana como con la diana correspondiente del modelo animal, *por ejemplo*, TROP2 de ratón o TROP2 de macaco cangrejero (cyno). En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 parental se une a TROP2 humana con una afinidad de aproximadamente 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 10 nM o menos, y a TROP2 de macaco cangrejero con una afinidad de aproximadamente 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, 50 nM o menos, 15 nM o menos o 10 nM o menos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad, identificada después de una ronda de selección, se une a TROP2 humana con una afinidad de aproximadamente 5 nM o menos, tal como 1 nM o menos, y a TROP2 de cynomolgus con una afinidad de aproximadamente 7,5 nM o menos, tal como 1 nM o menos. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TROP2 madurada por afinidad, identificada después de dos rondas de selección, se une a TROP2 humana con una afinidad de

aproximadamente 2,5 nM o menos, y a TROP2 de cynomolgus con una afinidad de aproximadamente 3,5 nM o menos.

[0083] En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende un polipéptido de dominio de unión específico de antígeno que se une específicamente a dianas, tales como dianas en células enfermas o dianas en otras células que soportan el estado enfermo, tales como dianas en células estromales que soportan el crecimiento tumoral o dianas en células inmunitarias que soportan la inmunosupresión mediada por enfermedades. En algunos ejemplos, el dominio de unión específico de antígeno incluye anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, Fab, Fv, dominios de unión al receptor de linfocitos T, dominios de unión a ligando, dominios de unión a receptor, anticuerpos de dominio, anticuerpos de un solo dominio, minicuerpos, nanocuerpos, peptidocuerpos, o varios otros imitadores de anticuerpos (tales como AFFIMERS®, afitinas, alfacuerpos, atrímeros, moléculas basadas en CTLA4, adnectinas, anticalinas, proteínas basadas en el dominio de Kunitz, avímeros, knotinas, finómeros, DARPINS®, aficuerpos, afillinas, monocuerpos y proteínas basadas en proteínas de repetición de armadillo).

[0084] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un anticuerpo anti-TROP2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o una variante de anticuerpo del dominio de unión a TROP2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "variante de anticuerpo" se refiere a variantes y derivados de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-TROP2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos anti-TROP2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento, para mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de los mismos. Un método ilustrativo para preparar variantes de aminoácidos incluye, pero sin limitación, introducir modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo.

[0085] Puede efectuarse cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno. En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las CDR y las regiones marco. A continuación se describen ejemplos de tales

sustituciones. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo o fragmentos de unión de antígeno del mismo de interés y los productos cribados para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos alterada (ADCC), o citotoxicidad mediada por linfocitos T mejorada (TDCC). Se contemplan sustituciones de aminoácidos tanto conservativas como no conservativas para preparar las variantes de anticuerpo.

[0086] En otro ejemplo de una sustitución para crear una variante de anticuerpo anti-TROP2 o fragmentos de unión a antígeno del mismo, se sustituyen uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo original. En general, las variantes se seleccionan a continuación basándose en las mejoras en las propiedades deseadas en comparación con un anticuerpo original o fragmentos de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, afinidad mejorada, afinidad reducida, inmunogenicidad reducida, dependencia de unión de pH aumentada.

[0087] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un anticuerpo de dominio único (sdAb) tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable (VHH) de un sdAb derivado de llama, un péptido, un ligando o una entidad de molécula pequeña específica para TROP2. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 descrito en el presente documento es cualquier dominio que se una a TROP2, incluyendo, pero sin limitación, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un anticuerpo de dominio único. En otras realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un péptido. En realizaciones adicionales, el dominio de unión a TROP2 es una molécula pequeña.

[0088] Generalmente, cabe señalar que la expresión anticuerpo de dominio único tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio no se limita a una fuente biológica específica o a un método de preparación específico. Los anticuerpos de dominio simple son anticuerpos cuyas regiones de determinación de complementariedad forman parte de un polipéptido de dominio simple. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de cadena pesada, anticuerpos desprovistos naturalmente de cadenas ligeras, anticuerpos de dominio simple derivados de anticuerpos de 4 cadenas convencionales, anticuerpos modificados y armazones de dominio simple diferentes de los derivados de anticuerpos. Los anticuerpos de dominio único pueden ser cualquiera de la técnica o cualquier anticuerpo de dominio único futuro. Los anticuerpos de dominio simple pueden derivarse de cualquier especie incluyendo, pero sin limitación, ratón, ser humano, camellos, llama, cabra, conejo, bovino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de dominio único de la divulgación se obtienen: (1) por aislamiento del dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada de origen natural; (2) por expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica un

dominio VHH de origen natural; (3) por "humanización" de un dominio VHH de origen natural o por expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio VHH humanizado de este tipo; (4) por "camelización" de un dominio VH de origen natural de cualquier especie animal, y en particular de una especie de mamífero, tal como de un ser humano, o por expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio VH camelizado de este tipo; (5) por "camelización" de un "anticuerpo de dominio" o "Dab", o por expresión de un ácido nucleico que codifica un dominio VH camelizado de este tipo; (6) por el uso de técnicas sintéticas o semisintéticas para preparar proteínas, polipéptidos u otras secuencias de aminoácidos; (7) por preparación de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de dominio único usando técnicas para la síntesis de ácidos nucleicos conocidas en el campo, seguido de expresión del ácido nucleico así obtenido; y/o (8) por cualquier combinación de uno o más de los anteriores.

[0089] En una realización, un anticuerpo de dominio único corresponde a los dominios VHH de anticuerpos de cadena pesada de origen natural dirigidos contra TROP2. Como se describe adicionalmente en el presente documento, tales secuencias de VHH generalmente pueden generarse u obtenerse inmunizando adecuadamente una especie de Llama con TROP2, (es decir, para generar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra TROP2), obteniendo una muestra biológica adecuada de dicha Llama (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células B), y generando secuencias de VHH dirigidas contra TROP2, a partir de dicha muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida en el campo.

[0090] En otra realización, tales dominios VHH de origen natural contra TROP2, se obtienen a partir de bibliotecas sin tratar de secuencias de VHH de camélidos, por ejemplo, examinando una biblioteca de este tipo usando TROP2, o al menos una parte, fragmento, determinante antigénico o epítipo del mismo usando una o más técnicas de detección conocidas en el campo. Tales bibliotecas y técnicas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 y WO 03/035694. Como alternativa, se utilizan bibliotecas sintéticas o semisintéticas mejoradas derivadas de bibliotecas de VHH sin tratar, tales como bibliotecas de VHH obtenidas a partir de bibliotecas de VHH sin tratar mediante técnicas tales como mutagénesis aleatoria y/o mezclado de CDR, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/43507.

[0091] En una realización adicional, otra técnica más para obtener secuencias de VHH dirigidas contra TROP2, implica inmunizar adecuadamente un mamífero transgénico que es capaz de expresar anticuerpos de cadena pesada (es decir, para provocar una respuesta inmunitaria y/o anticuerpos de cadena pesada dirigidos contra TROP2), obtener una muestra biológica adecuada de dicho mamífero transgénico (tal como una muestra de sangre, muestra de suero o muestra de células B), y a continuación generar secuencias de VHH dirigidas contra TROP2, a partir de dicha

muestra, usando cualquier técnica adecuada conocida en el campo. Por ejemplo, para este fin, se pueden usar las ratas o ratones que expresan anticuerpos de cadena pesada y los métodos y técnicas adicionales descritos en el documento WO 02/085945 y en el documento WO 04/049794.

[0092] En algunas realizaciones, un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 de esta divulgación comprende un anticuerpo de dominio único con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano y/o un dominio VHH de origen natural, por ejemplo, un anticuerpo anti-TROP2 de llama, pero que se ha "humanizado", es decir, reemplazando uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho anti-TROP2 no humano y/o la secuencia de VHH natural (y en particular en las secuencias marco) por uno o más de los restos de aminoácidos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano (*por ejemplo*, como se ha indicado anteriormente). Esto se puede realizar de una manera conocida en el campo, que será evidente para el experto en la materia, por ejemplo, basándose en la descripción adicional en el presente documento. De nuevo, cabe señalar que tales anticuerpos de dominio único anti-TROP2 humanizados de la divulgación se obtienen de cualquier manera adecuada conocida *per se* (es decir, como se ha indicado en los puntos (1)-(8) anteriores) y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido que comprende un dominio VHH natural como material de partida. En algunas realizaciones adicionales, un anticuerpo anti-TROP2 de dominio único, como se describe en el presente documento, comprende un anticuerpo de dominio único con una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural, pero que se ha "camelizado", es decir, reemplazando uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH de origen natural de un anticuerpo de 4 cadenas convencional por uno o más de los restos de aminoácidos que se producen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VHH de un anticuerpo de cadena pesada. Tales sustituciones de "camelización" se insertan preferentemente en posiciones de aminoácidos que forman y/o están presentes en la interfaz VH-VL, y/o en los denominados restos distintivos de Camelidae. Véase, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994 y 1996)). Preferentemente, la secuencia de VH que se usa como material de partida o punto de partida para generar o diseñar el dominio único camelizado es preferentemente una secuencia de VH de un mamífero, más preferentemente la secuencia VH de un ser humano, tal como una secuencia de VH3. Sin embargo, cabe señalar que tales anticuerpos de dominio único anti-TROP2 camelizados de la divulgación, en determinadas realizaciones, se obtienen de cualquier manera adecuada conocida en el campo (es decir, como se ha indicado en los puntos (1)-(8) anteriores) y, por lo tanto, no se limitan estrictamente a polipéptidos que se han obtenido usando un polipéptido

que comprende un anticuerpo anti-TROP2 no humano y/o el dominio VH de origen natural como material de partida. Por ejemplo, como se describe adicionalmente en el presente documento, tanto la "humanización" como la "camelización" se realizan proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VHH o dominio VH de origen natural, respectivamente, y luego cambiando, uno o más codones en dicha secuencia de nucleótidos de tal manera que la nueva secuencia de nucleótidos codifica un anticuerpo de dominio único "humanizado" o "camelizado", respectivamente. Este ácido nucleico puede expresarse después, para proporcionar un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 deseado de la divulgación. Como alternativa, en otras realizaciones, basándose en la secuencia de aminoácidos de un dominio VHH o dominio VH de origen natural, respectivamente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de dominio único anti-TROP2 humanizado o camelizado deseado de la divulgación, respectivamente, se diseñan y luego se sintetizan *de novo* usando técnicas conocidas para la síntesis de péptidos. En algunas realizaciones, basándose en la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos de un dominio VHH o dominio VH de origen natural, respectivamente, una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de dominio único anti-TROP2 humanizado o camelizado deseado de la divulgación, respectivamente, se diseña y luego se sintetiza *de novo* usando técnicas conocidas para la síntesis de ácidos nucleicos, después de lo cual el ácido nucleico así obtenido se expresa usando técnicas de expresión conocidas, para proporcionar el anticuerpo de dominio único anti-TROP2 deseado de la divulgación.

[0093] Otros métodos y técnicas adecuados para obtener el anticuerpo de dominio único anti-TROP2 de la divulgación y/o los ácidos nucleicos que codifican el mismo, partiendo de secuencias de VH de origen natural o secuencias de VHH, por ejemplo, comprende combinar una o más partes de una o más secuencias de VH de origen natural (tal como una o más secuencias marco (FR) y/o secuencias de región determinante de complementariedad (CDR), una o más partes de una o más secuencias de VHH de origen natural (tal como una o más secuencias de FR o secuencias de CDR) y/o una o más secuencias sintéticas o semisintéticas, de una manera adecuada, para proporcionar un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 de la divulgación o una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que codifica el mismo.

[0094] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un anticuerpo específico anti-TROP2 que comprende una región determinante de complementariedad variable de cadena pesada CDR1, una variable de cadena pesada CDR2, una variable de cadena pesada CDR3, una variable de cadena ligera CDR1, una variable de cadena ligera CDR2 y una variable de cadena ligera CDR3. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende cualquier dominio que se una a TROP2, incluyendo, pero sin limitación, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo

policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o fragmentos de unión a antígeno tales como anticuerpos de dominio único (sdAb), Fab, Fab', fragmentos F(ab)₂ y Fv, fragmentos que comprenden una o más CDR, anticuerpos de cadena sencilla (*por ejemplo*, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv)), fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), anticuerpos heteroconjugados (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), fragmentos pFv, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera y dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un único anticuerpo de dominio. En algunas realizaciones, el anticuerpo de dominio único anti-TROP2 comprende regiones determinantes de complementariedad variable (CDR) de cadena pesada, CDR1, CDR2 y CDR3.

[0095] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cuatro regiones/secuencias marco (f1-f4) interrumpidas por tres regiones/secuencias determinantes de complementariedad, como se representa por la fórmula: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, en donde r1, r2 y r3 son regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y los dominios f1, f2, f3 y f4 son restos marco. Los restos marco de la proteína de unión a TROP2 de la presente divulgación comprenden, *por ejemplo*, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93 o 94 restos de aminoácidos, y las regiones determinantes de complementariedad comprenden, *por ejemplo*, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

[0096] En algunas realizaciones, las proteínas de unión descritas en el presente documento comprenden un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, subsecuencias de los mismos y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende al menos 70 %-95 % o más de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, subsecuencias de los mismos y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende al menos el 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 63 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, subsecuencias de los mismos y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende al menos 70 %-95 % o más de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, subsecuencias de los mismos y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende al menos el

60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 63 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, subsecuencias de los mismos y variantes de los mismos.

[0097] En algunas realizaciones, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 58-114 o una secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114. En algunas realizaciones, la CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171. En algunas realizaciones, la CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones en comparación con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

[0098] En diversas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 de la presente divulgación es al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, al menos aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, 115-171 y 172-228.

[0099] En diversas realizaciones, una región determinante de la complementariedad del dominio de unión a TROP2 de la presente divulgación es al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, 115-171 y 172-228.

aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 58-114.

[00100] En diversas realizaciones, una región determinante de la complementariedad del dominio de unión a TROP2 de la presente divulgación es al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 115-171.

[00101] En diversas realizaciones, una región determinante de la complementariedad del dominio de unión a TROP2 de la presente divulgación es al menos aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 172-228.

[00102] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es de reacción cruzada con TROP2 humana, de macaco cangrejero y de ratón. En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 es específico para TROP2 humana. En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a TROP2 humana con una K_D humana ($h K_D$). En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a TROP2 de macaco cangrejero con una K_D cyno ($c K_D$). En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a TROP2 de macaco cangrejero con una K_D de ratón ($m K_D$). En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen tanto a TROP2 de macaco cangrejero como a una TROP2 humana, con una K_D cyno ($c K_D$) y una K_D humana ($h K_D$), respectivamente. En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a TROP2 de macaco cangrejero, TROP2 de ratón y una TROP2 humana, con una K_D cyno ($c K_D$), K_D de ratón ($m K_D$) y una K_D humana ($h K_D$), respectivamente. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 se une a TROP2 humana, de ratón y macaco cangrejero con afinidades de unión comparables (es decir, los valores $h K_D$, $m K_D$ y $c K_D$ no difieren en más de $\pm 10 \%$). En algunas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a Trop2 en presencia de calcio. En algunas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 divulgados en el presente documento se unen a Trop2 en ausencia de calcio.

[00103] En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 500 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 450 nM. En algunas realizaciones, $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 400 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 350 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 300 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 250 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 150 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 100 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 80 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 50 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente

40 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 150 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 100 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 90 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 80 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 70 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,4 nM a aproximadamente 50 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,5 nM a aproximadamente 30 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,6 nM a aproximadamente 10 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,7 nM a aproximadamente 8 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,8 nM a aproximadamente 6 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 0,9 nM a aproximadamente 4 nM. En algunas realizaciones, la $h K_D$, la $m K_D$ y la $c K_D$ varían de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 2 nM.

[00104] En algunas realizaciones, la $h k_{on}$ (1/Ms) e5, $c k_{on}$ (1/Ms) e5, $m k_{on}$ (1/Ms) e5 varía de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1, aproximadamente 0,5-0,9. En algunas realizaciones, la $h K_{off}$ (1/s), $c K_{off}$ (1/s) y $m K_{off}$ (1/s) varía de aproximadamente 1×10^{-2} a 9×10^{-6} , por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-2} a 9×10^{-3} , aproximadamente 4×10^{-3} a 6×10^{-3} .

[00105] En algunas realizaciones, cualquiera de los dominios de unión a TROP2 anteriores (*por ejemplo*, anticuerpos de dominio único anti-TROP2 de SEQ ID NO: 1-57) están marcados con péptido de afinidad para facilitar la purificación. En algunas realizaciones, la etiqueta de péptido de afinidad es de seis restos de histidina consecutivos, también denominado 6×-His (SEQ ID NO: 496).

[00106] En determinadas realizaciones, los dominios de unión a TROP2 de la presente divulgación se unen preferentemente a TROP2 unido a membrana sobre TROP2 soluble. TROP2 unido a membrana se refiere a la presencia de TROP2 en o sobre la superficie de membrana celular de una célula que expresa TROP2. TROP2 soluble se refiere a TROP2 que ya no está en o sobre la superficie de la membrana celular de una célula que expresa o expresó TROP2. En determinados casos, la TROP2 soluble está presente en la circulación sanguínea y/o linfática en un sujeto. En una realización, los dominios de unión a TROP2 se unen a TROP2 unido a membrana al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50

veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces más que la TROP2 soluble. En una realización, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se unen preferentemente a TROP2 unido a membrana 30 veces más que a TROP2 soluble. Determinar la unión preferencial de una proteína de unión a antígeno a TROP2 unida a membrana sobre TROP2 soluble puede determinarse fácilmente usando ensayos de unión.

[00107] Se contempla que, en algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 sea bastante pequeña y de no más de 40 kDa, no más de 30 kDa, no más de 25 kDa, no más de 20 kDa, no más de 15 kDa o no más de 10 kDa en algunas realizaciones. En determinados casos, la proteína de unión a TROP2 es de 5 kDa o menos si es una entidad peptídica o de molécula pequeña.

[00108] En otras realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento comprenden aglutinantes de entidad de molécula pequeña (SME) para TROP2. Los aglutinantes de SME son moléculas pequeñas con un tamaño promedio de aproximadamente 500 a 2000 Da y se unen a las proteínas de unión a TROP2 mediante métodos conocidos, tal como el ligamiento o conjugación de sortasa. En estos casos, la proteína de unión a TROP2 comprende un dominio que comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa, por ejemplo, LPETG (SEQ ID NO: 548). Para unir un aglutinante de SME a la proteína de unión a TROP2 que comprende una secuencia de reconocimiento de sortasa, la proteína se incuba con una sortasa y un aglutinante de SME, de modo que la sortasa une el aglutinante de SME a la secuencia de reconocimiento. En otras realizaciones más, las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento comprenden un péptido de knotina para unirse a TROP2. Las knotinas son péptidos estabilizados con disulfuro con un armazón de nudo de cisteína y tienen tamaños promedio de aproximadamente 3,5 kDa. Se han contemplado knotinas para unirse a ciertas moléculas tumorales tales como TROP2. En realizaciones adicionales, las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento comprenden un ligando de TROP2 natural.

[00109] En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 comprende más de un dominio y tiene un diseño de polipéptido único con enlace flexible de los dominios. Esto permite una fácil producción y fabricación de las proteínas de unión a TROP2, ya que pueden codificarse por una única molécula de ADNc para incorporarse fácilmente en un vector. Además, en algunas realizaciones donde las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento son una cadena polipeptídica única monomérica, no hay problemas de emparejamiento de cadena o un requisito para la dimerización. Se contempla que, en tales realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento tengan una tendencia reducida a agregarse.

[00110] En las proteínas de unión a TROP2 que comprenden más de un dominio, los dominios están enlazados por uno o más enlazadores internos. En determinadas realizaciones, los enlazadores

internos son "cortos", es decir, consisten en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 restos de aminoácidos. Por lo tanto, en determinados ejemplos, los enlazadores internos consisten en aproximadamente 12 o menos restos de aminoácidos. En el caso de 0 restos de aminoácidos, el enlazador interno es un enlace peptídico. En determinadas realizaciones, los enlazadores internos son "largos", es decir, consisten en 15, 20 o 25 restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, los enlazadores internos consisten en aproximadamente 3 a aproximadamente 15, por ejemplo, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos contiguos. Con respecto a la composición de aminoácidos de los enlazadores internos, los péptidos se seleccionan con propiedades que confieren flexibilidad a las proteínas de unión a TROP2, que no interfieren con los dominios de unión, así como que resisten la escisión de proteasas. Por ejemplo, los restos de glicina y serina generalmente proporcionan resistencia a proteasas. Los ejemplos de enlazadores internos adecuados para unir los dominios en las proteínas de unión a TROP2 incluyen, pero sin limitación, (GS)_n (SEQ ID NO: 514), (GGS)_n (SEQ ID NO: 515), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 516), (GGSG)_n (SEQ ID NO: 517), (GGSGG)_n (SEQ ID NO: 518), (GGGGGS)_n (SEQ ID NO: 519), (GGGGG)_n (SEQ ID NO: 520) o (GGG)_n (SEQ ID NO: 521), en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En una realización, el enlazador es (GGGGSGGGSGGGSGGGGS) (SEQ ID NO: 522), (GGGGSGGGSGGGGS) (SEQ ID NO: 523) o (GGGGSGGGGS) (SEQ ID NO: 524).

[00111] En algunos casos, donde la proteína de unión a TROP2 comprende más de un dominio, los dominios dentro de las proteínas de unión a TROP2 se conjugan usando un método de conjugación específico de sitio enzimático que implica el uso de una enzima transglutaminasa de mamífero o bacteriana. Las transglutaminasas microbianas (mTG) son herramientas versátiles en la investigación y la biotecnología modernas. La disponibilidad de grandes cantidades de enzimas relativamente puras, la facilidad de uso y la falta de regulación por calcio y guanosina-5'-trifosfato (GTP) ha impulsado a mTG a ser la principal enzima de reticulación utilizada tanto en la industria alimentaria como en la biotecnología. Actualmente, los mTG se usan en muchas aplicaciones para unir proteínas y péptidos a moléculas pequeñas, polímeros, superficies, ADN, así como a otras proteínas. Véase, por ejemplo, Pavel Strp, Veracity of microbial transglutaminase, *Bioconjugate Chem.* 25, 5, 855-862.

[00112] En algunos ejemplos, se proporcionan proteínas de unión a TROP2 que comprenden más de un dominio, en donde uno de los dominios comprende una glutamina aceptora en una región constante, que luego puede conjugarse a otro dominio vía un enlazador basado en lisina (*por ejemplo*, cualquier cadena de amina primaria que sea un sustrato para TGasa, *por ejemplo*, que comprende una alquilamina, oxoamina) en donde la conjugación se produce exclusivamente en uno o más restos de glutamina aceptores presentes en el resto de direccionamiento fuera del sitio de

combinación de antígeno (*por ejemplo*, fuera de una región variable, en una región constante). Por lo tanto, la conjugación no se produce en una glutamina, *por ejemplo*, una glutamina expuesta al menos parcialmente en la superficie, dentro de la región variable. La proteína de unión a TROP2, en algunos ejemplos, se forma haciendo reaccionar uno de los dominios con un enlazador basado en lisina en presencia de una TGasa.

[00113] En algunas realizaciones, donde uno o más dominios dentro de las proteínas de unión a TROP2 se unen directamente, se crea un vector híbrido en el que el ADN que codifica los dominios unidos directamente se liga directamente entre sí. En algunas realizaciones, donde se usan enlazadores, se hace un vector híbrido donde el ADN que codifica un dominio se liga al ADN que codifica un extremo de un resto enlazador y el ADN que codifica otro dominio se liga al otro extremo del resto enlazador.

[00114] En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 es un fragmento variable de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único, tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de anticuerpo de dominio único derivado de camélido. En otras realizaciones, la proteína de unión a TROP2 es un dominio de unión no de Ig, es decir, un mimético de anticuerpo, tal como anticalinas, afilinas, moléculas affibody, AFFIMERS®, afitinas, alfacuerpos, avímeros, DARPINS®, finómeros, péptidos de dominio Kunitz y monocuerpos. En realizaciones adicionales, la proteína de unión a TROP2 es un ligando o péptido que se une o se asocia con TROP2. En más realizaciones adicionales, la proteína de unión a TROP2 es una knotina. En más realizaciones adicionales, el dominio de unión a TROP2 es una entidad molecular pequeña.

[00115] En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de acuerdo con la presente divulgación pueden incorporarse en proteínas triespecíficas dirigidas a TROP2. En algunas realizaciones, las proteínas triespecíficas comprenden un dominio de unión a CD3, un dominio de extensión de semivida y un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con esta divulgación. En algunas realizaciones, la proteína triespecífica de unión a TROP2 comprende un anticuerpo triespecífico.

Proteínas dirigidas a TROP2 multiespecíficas, tales como proteínas triespecíficas dirigidas a TROP2 (también denominadas en el presente documento proteínas o moléculas TriTAC dirigidas a TROP2)

[00116] En un aspecto, se describe en el presente documento una proteína multiespecífica o multivalente que comprende una proteína de unión a TROP2 de acuerdo con la presente divulgación. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a CD3. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende

además un dominio que se une específicamente a CD3 humano. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a CD3-gamma. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a CD3-delta. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a CD3-épsilon.

[00117] En realizaciones adicionales, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente al receptor de linfocitos T (TCR). En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a la cadena alfa del TCR. En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica comprende además un dominio que se une específicamente a la cadena β del TCR.

[00118] En determinadas realizaciones, el dominio de unión a CD3 de la proteína multiespecífica exhibe no solo potentes afinidades de unión a CD3 con CD3 humano, sino que también muestra una excelente reactividad cruzada con las respectivas proteínas CD3 de macaco cangrejero. En algunos casos, el dominio de unión a CD3 de las proteínas multiespecíficas es de reacción cruzada con CD3 del macaco cangrejero. En determinados casos, las relaciones de K_D humana:macaco cangrejero (hK_D : $c K_D$) para la unión de CD3 están entre 20:1 y 1:2.

[00119] En algunas realizaciones, el dominio de unión a CD3 de la proteína multiespecífica es cualquier dominio que se una a CD3, incluyendo, pero sin limitación, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de unión a CD3, tales como anticuerpos de dominio único (sdAb), Fab, F(ab')₂, y fragmentos Fv, fragmentos que comprenden una o más CDR, anticuerpos de cadena sencilla (*por ejemplo*, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv)), fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), anticuerpos heteroconjugados (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), fragmentos pFv, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera y dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera. En algunos casos, es beneficioso que el dominio de unión a CD3 se derive de la misma especie en la que se usará finalmente la proteína multiespecífica que comprende una proteína de unión a albúmina sérica de dominio único descrita en el presente documento. Por ejemplo, para su uso en seres humanos, puede ser beneficioso que el dominio de unión a CD3 de la proteína multiespecífica que comprende una proteína de unión a TROP2 descrita en el presente documento comprenda restos humanos o humanizados del dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Secuencia de aminoácidos ilustrativa para el dominio de unión a CD3 de una TROP2 multiespecífica (*por ejemplo*, triespecífica) que se dirige a la proteína TriTAC de esta divulgación se proporciona como SEQ ID NO: 494, o una secuencia de

aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 % a 100 % idéntica a SEQ ID NO: 494, tal como al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

[00120] En algunas realizaciones, el dominio de unión a albúmina sérica (también denominado en el presente documento dominio de extensión de la semivida) de una proteína multiespecífica que comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento puede ser cualquier dominio que se una a la albúmina sérica, incluyendo, pero sin limitación, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el dominio de unión a albúmina sérica son unos fragmentos variables de cadena única (scFv), un anticuerpo de dominio único, tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de sdAb derivado de camélido, o fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de unión a HSA, tales como Fab, F(ab')₂, y fragmentos Fv, fragmentos que comprenden una o más CDR, anticuerpos de cadena sencilla (*por ejemplo*, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv)), fragmentos Fv estabilizados con disulfuro (dsFv), anticuerpos heteroconjugados (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), fragmentos pFv, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera y dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, péptido, ligando o entidad de molécula pequeña específica para la albúmina sérica. En determinadas realizaciones, el dominio de unión a HSA es un anticuerpo de dominio único. En otras realizaciones, el dominio de unión a albúmina sérica es un péptido. En realizaciones adicionales, el dominio de unión a la albúmina sérica es una molécula pequeña. Se contempla que el dominio de unión a albúmina sérica de la proteína de unión multiespecífica que comprende una proteína de unión a CD3 de fragmento variable de cadena única es bastante pequeño y de no más de 25 kDa, no más de 20 kDa, no más de 15 kDa o no más de 10 kDa en algunas realizaciones. En determinados casos, la unión de seroalbúmina es de 5 kDa o menos si es una entidad peptídica o de molécula pequeña. Secuencia de aminoácidos ilustrativa para un dominio de unión a albúmina sérica de un dominio multiespecífico (*por ejemplo*, triespecífica) TROP2 que se dirige a la proteína TriTAC de esta divulgación se proporciona como SEQ ID NO: 493 o 566, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 % a 100 % idéntica a SEQ ID NO: 493 o 566, tal como al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 493 o 566.

aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 493 o 549.

[00121] El dominio de extensión de la semivida de una proteína de unión multiespecífica, como se describe en el presente documento, que comprende una proteína de unión a CD3 de fragmento variable de cadena única proporciona una farmacodinámica y farmacocinética alteradas de la propia proteína de unión a CD3 de fragmento variable de cadena única. Como anteriormente, el dominio de ampliación de semivida prolonga el semitiempo de eliminación. El dominio de ampliación de semivida altera las propiedades farmacodinámicas, incluyendo la alteración de la distribución tisular, penetración y difusión de la proteína de unión a CD3 de fragmento variable de cadena única. En algunas realizaciones, el dominio de extensión de la semivida proporciona una orientación mejorada del tejido (incluido el tumor), distribución tisular, penetración tisular, difusión dentro del tejido y eficacia mejorada en comparación con una proteína sin un dominio de extensión de semivida. En una realización, los métodos terapéuticos utilizan de manera eficaz y eficiente una cantidad reducida de la proteína de unión multiespecífica que comprende una proteína de unión a CD3 de fragmento variable de cadena única, dando como resultado efectos secundarios reducidos, tal como reducidos fuera de la diana, tal como citotoxicidad de células no tumorales.

[00122] Además, la afinidad de unión del dominio de extensión de la semivida, en algunas realizaciones, se selecciona para dirigirse a un tiempo medio de eliminación específico en una proteína de unión multiespecífica particular que comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el dominio de ampliación de semivida tiene una afinidad de unión elevada. En otras realizaciones, el dominio de ampliación de semivida tiene una afinidad de unión media. En otras realizaciones más, el dominio de ampliación de semivida tiene una afinidad de unión baja o marginal. Las afinidades de unión ilustrativas incluyen K_D de 10 nM o menos (alta), entre 10 nM y 100 nM (media) y mayores de 100 nM (baja). Como anteriormente, las afinidades de unión a la albúmina sérica se determinan mediante métodos conocidos tales como resonancia de plasmones superficiales (SPR).

[00123] Una proteína multiespecífica dirigida a TROP2 de esta divulgación, en determinadas realizaciones, comprende (A) un primer dominio que se une a un CD3; (B) un segundo dominio que es un dominio de extensión de semivida; y (C) un tercer dominio que es una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, el primer dominio comprende un scFv que se une específicamente al CD3. El CD3, por ejemplo, es una proteína CD3 humana. En determinadas realizaciones, el segundo dominio comprende un sdAb que

se une específicamente a una proteína de suero en masa. En algunos casos, la proteína sérica en masa es albúmina, tal como, una albúmina sérica, tal como, una albúmina sérica humana. Los dominios (A), (B) y (C), están, en algunas realizaciones, vinculados a través de enlazadores L1 y L2, en cualquiera de las siguientes orientaciones: H₂N-(A)-L1-(C)-L2-(B)-COOH, H₂N-(B)-L1-(A)-L2-(C)-COOH, H₂N-(C)-L1-(B)-L2-(A)-COOH, H₂N-(C)-L1-(A)-L2-(B)-COOH, H₂N-(A)-L1-(B)-(C)-L2-COOH o H₂N-(B)-(C)-(A)-COOH.

[00124] Una proteína multiespecífica dirigida a TROP2 de esta divulgación, en algunas realizaciones, comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente del 70 % a aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57 y 229-264. En algunas realizaciones, una proteína multiespecífica dirigida a TROP2 de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 76 %, al menos aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, al menos aproximadamente el 79 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 81 %, al menos aproximadamente el 82 %, al menos aproximadamente el 83 %, al menos aproximadamente el 84 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 86 %, al menos aproximadamente el 87 %, al menos aproximadamente el 88 %, al menos aproximadamente el 89 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 91 %, al menos aproximadamente el 92 %, al menos aproximadamente el 93 %, al menos aproximadamente el 94 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 96 %, al menos aproximadamente el 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, al menos aproximadamente el 99 %, a aproximadamente 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57 y 229-264.

Proteínas dirigidas a TROP2 multiespecíficas condicionalmente activas, tales como proteínas triespecíficas dirigidas a TROP2 condicionalmente activas (también denominadas en el presente documento proteínas o moléculas protriespecíficas ProTriTAC dirigidas a TROP2)

[00125] Una realización de esta divulgación proporciona una proteína multiespecífica condicionalmente activa que comprende un dominio de unión a TROP2 como se divulga en el presente documento (por ejemplo, en alguna realización esta divulgación proporciona una proteína protriespecífica/ProTriTAC dirigida a TROP2 que comprende un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación).

[00126] En algunas realizaciones, la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende además un dominio que se une específicamente a un CD3 y un resto de unión que se une específicamente a una proteína de suero en masa, tal como una albúmina sérica humana. En

algunas realizaciones, el resto de unión es capaz de enmascarar, o enmascara, la interacción del dominio de unión a TROP2 o el dominio de unión a CD3, a sus dianas. En algunas realizaciones, un resto de unión de esta divulgación comprende un resto de enmascaramiento y un enlazador escindible, tal como un enlazador escindible por proteasa. Secuencias ilustrativas para el resto de enmascaramiento dentro de un resto de unión que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560, o una secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende una secuencia de bucle no de CDR modificada y un enlazador escindible. En algunas realizaciones, el enlazador escindible comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia de aminoácidos que comprende una o sustituciones con respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543. En algunas realizaciones, el resto de enmascaramiento comprende una secuencia de bucle no de CDR modificada y un enlazador no escindible. En algunas realizaciones, el enlazador no escindible comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 544 o 545, o una secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones con respecto a la SEC ID NO: 544 o 545. En algunas realizaciones, un resto de unión comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 549. En algunas realizaciones, un dominio de unión a CD3 de un ProTriTAC de TROP2 de esta divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

[00127] En algunas realizaciones, una ProTriTAC dirigida a TROP2 de esta divulgación comprende, desde el extremo N al extremo C, un resto de unión que es un dominio anti-ALB que comprende un bucle no de CDR con un sitio de unión para un dominio de unión a CD3 (*por ejemplo*, un dominio de unión a CD3 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 549, o al menos

aproximadamente un 75 % de identidad con la misma), un enlazador escindible, el dominio de unión a CD3 y, en el extremo C-terminal, el dominio de unión anti-TROP2. El dominio de unión a TROP2 de la ProTriTAC, en algunas realizaciones, es de al menos aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 61 %, al menos aproximadamente el 62 %, aproximadamente el 63 %, aproximadamente el 64 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 66 %, aproximadamente el 67 %, aproximadamente el 68 %, aproximadamente el 69 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 71 %, aproximadamente el 72 %, aproximadamente el 73 %, aproximadamente el 74 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 76 %, aproximadamente el 77 %, aproximadamente el 78 %, aproximadamente el 79 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 81 %, aproximadamente el 82 %, aproximadamente el 83 %, aproximadamente el 84 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 86 %, aproximadamente el 87 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

[00128] En algunas realizaciones, una ProTriTAC dirigida a TROP2 de esta divulgación comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57 y 229-264. En algunas realizaciones, una ProTriTAC dirigida a TROP2 de la presente divulgación comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-57 y 229-264, una composición farmacéutica que comprende la misma, y un método de uso de la misma para tratar una enfermedad, tal como una enfermedad tumoral como se describe en el presente documento.

[00129] En algunas realizaciones, una ProTriTAC dirigida a TROP2 de esta divulgación en un formato de profármaco no escindible, comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57 y 229-264.

aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

[00130] Una secuencia ilustrativa para un fármaco dirigido (CT) a TROP2 activa, como se describe en el presente documento, es una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57 y 229-264.

[00131] El resto de unión es capaz de expandir sinérgicamente una ventana terapéutica de una proteína protriespecífica de TROP2 condicionalmente activa, tanto por enmascaramiento estérico como por enmascaramiento específico. En algunas realizaciones, el resto de unión combina tanto el enmascaramiento estérico (por ejemplo, a través de unión a una albúmina sérica en masa) y enmascaramiento específico (por ejemplo, a través de bucles no de CDR que se unen a las CDR de un dominio anti-TROP2 o un anti-CD3 dominio scFv). Por ejemplo, el resto de unión enmascara o es capaz de enmascarar la unión del dominio de unión a TROP2 (*por ejemplo*., oculta el dominio de unión a TROP2 y/o evita la unión prematura), hasta que la activación y la capacidad de una secuencia para "enmascarar" se pueda ensayar utilizando un ensayo donde la actividad con y sin la secuencia de enmascaramiento (*por ejemplo*, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 550 y 558-560) se compare. Brevemente, para ensayar el enmascaramiento, se elaboran construcciones ProCAR con y sin restos de enmascaramiento en, por ejemplo, bucles CC'. Los linfocitos T se infectan con lentivirus elaborados a partir de las construcciones para generar células CAR-T, que posteriormente se tiñen con anticuerpos anti-FLAG y TROP2-Fc junto con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia y analizados por citometría de flujo. Se generan y comparan gráficos de puntos de tinción. En algunos casos, el resto de enmascaramiento es un péptido/resto de enmascaramiento, insertado en uno o más bucles no de CDR, de tal manera que el resto de unión se une e inhibe el dominio de unión a antígeno de TROP2 hasta el momento en que la construcción se administra a un microentorno tumoral. En algunos casos, modificar los bucles no de CDR dentro del resto de unión no afecta a la unión de albúmina. El enlazador escindible por proteasa, en

algunos casos, habilita la activación de una proteína protriespecífica dirigida a TROP2 en un único evento proteolítico, permitiendo así una conversión más eficiente de la molécula protriespecífica en el microentorno tumoral. Además, la activación proteolítica asociada a tumores, en algunos casos, revela un reclutador de linfocitos T activo con una actividad mínima fuera del tumor después de la activación. La presente divulgación, en algunas realizaciones, proporciona un formato de reclutador de linfocitos T de semivida extendida (ProTriTAC) que comprende un resto de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, que en algunos casos representa un enfoque nuevo y mejorado para diseñar reclutadores de linfocitos T condicionalmente activos.

[00132] La semivida del dominio de unión a TROP2 en un formato protriespecífico condicionalmente activo, en algunas realizaciones, se extiende en la circulación sistémica usando el resto de unión como se ha descrito anteriormente, que actúa como un interruptor de seguridad que mantiene la proteína multiespecífica en el formato pro en un estado inerte hasta que alcanza el microentorno tumoral donde se activa condicionalmente mediante la escisión del enlazador y es capaz de unirse a su(s) antígeno(s) diana. El interruptor de seguridad, en ciertos casos, proporciona varias ventajas: algunos ejemplos que incluyen (i) expandir la ventana terapéutica de la proteína dirigida a TROP2 condicionalmente activa; (ii) reducir la disposición de fármaco mediada por diana manteniendo la proteína dirigida a TROP2 condicionalmente activa en la circulación sistémica; (iii) reducir la concentración de proteína activada indeseable en la circulación sistémica, minimizando así la propagación de la química, fabricar y controlar impurezas relacionadas, por ejemplo, producto farmacéutico preactivado, virus endógenos, proteínas de célula huésped, ADN, lixiviables, antiespumantes, antibióticos, toxinas, disolventes, metales pesados; (iv) reducir la concentración de proteínas activadas indeseables en la circulación sistémica, minimizando así la propagación de impurezas relacionadas con el producto, agregados, productos de descomposición, variantes de producto debidas a: oxidación, desamidación, desnaturalización, pérdida de Lys de extremo C en MAbs; (v) evitar la activación aberrante en circulación; (vi) reducir las toxicidades asociadas con la fuga de especies activadas del tejido enfermo u otras condiciones fisiopatológicas, por ejemplo, tumores, enfermedades autoinmunitarias, inflamaciones, infecciones víricas, eventos de remodelación de tejidos (tales como infarto de miocardio, cicatrización de heridas en la piel) o lesiones externas (tales como rayos X, tomografía computarizada, exposición a UV); y (vii) reducir la unión no específica de la proteína dirigida a TROP2 condicionalmente activa. Además, después de la activación, o en otras palabras, después de la ruptura del interruptor de seguridad, la proteína dirigida a TROP2 condicionalmente activa se separa del interruptor de seguridad que proporcionaba una semivida prolongada y, de esta manera, se elimina de la circulación. Por ejemplo, si el fármaco se activa inadvertidamente fuera de un entorno tumoral o si se filtra fuera de

un entorno tumoral después de la activación, es probable que se elimine rápidamente y es menos probable que cause daños a los tejidos normales, reduciendo así la toxicidad.

[00133] En algunas realizaciones, una proteína de unión a TROP2 multispecífica condicionalmente activa como se describe en el presente documento tiene un índice terapéutico mejorado en comparación con el de una proteína de unión a TROP2 que no es condicionalmente activa sino que es, más bien, constitutivamente activa. Por ejemplo, una ProTriTAC de TROP2, en algunas realizaciones, tiene un índice terapéutico aumentado con respecto a una TriTAC de TROP2. El aumento en el índice terapéutico, en algunas realizaciones, es de al menos aproximadamente 2 veces a aproximadamente 1000 veces, tal como de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 800 veces, de aproximadamente 6 veces a aproximadamente 800 veces, de aproximadamente 6 veces a aproximadamente 600 veces, de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 400 veces, de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 200 veces, de aproximadamente 30 veces a aproximadamente 150 veces, de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces. El aumento en el índice terapéutico, en algunas realizaciones, se atribuye a la conjugación del dominio de unión a TROP2 a un resto de unión como se ha descrito anteriormente, con el bucle no de CDR y el enlazador escindible.

[00134] Un "índice terapéutico" (TI) (también denominado "ventana terapéutica") es, en algunas realizaciones, una comparación de la cantidad mínima de un agente terapéutico (*por ejemplo*, una TriTAC de TROP2, una ProTriTAC de TROP2, una CAR de TROP2, una ProCAR de TROP2) que provoca el efecto terapéutico (*por ejemplo*, supervivencia mejorada de un paciente con un cáncer que expresa TROP2, tratado con un agente terapéutico como se ha mencionado anteriormente) a la dosis mínima tolerada. En algunos casos, la mejora del índice terapéutico se manifiesta en términos de una CE₅₀ mejorada de una TriTAC de TROP2 en comparación con una ProTriTAC de TROP2, en la destrucción mediada por linfocitos T de células cancerosas.

[00135] En algunas realizaciones, el formato de proteína dirigida a TROP2 condicionalmente activa le da al dominio de unión a TROP2 una semivida en suero significativamente más larga y reduce la probabilidad de su activación indeseable en la circulación, produciendo así una versión "biomejor".

[00136] Un el resto de unión como se describe en el presente documento comprende al menos un bucle no de CDR. En algunas realizaciones, un bucle no de CDR proporciona un sitio de unión para la unión del resto de unión a un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación. En algunos casos, el resto de unión enmascara la unión del dominio de unión a TROP2 a su antígeno diana, *por ejemplo*, a través de oclusión estérica, a través interacciones intermoleculares específicas, o una combinación de ambos.

[00137] En algunas realizaciones, un resto de unión como se describe en el presente documento comprende además regiones determinantes de complementariedad (CDR), por ejemplo, específicas para unirse a una proteína de suero en masa (*por ejemplo*, una albúmina sérica humana). En algunos casos, un resto de unión de esta divulgación es un dominio derivado de una molécula de inmunoglobulina (molécula de Ig). La Ig puede ser de cualquier clase o subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, etc.). Una cadena polipeptídica de una molécula de Ig se pliega en una serie de hebras beta paralelas unidas por bucles. En la región variable, tres de los bucles constituyen las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) que determinan la especificidad de unión a antígeno de la molécula. Una molécula de IgG comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o un fragmento de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está formada por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) con secuencia hipervariable y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos y/o normalmente forman bucles estructuralmente definidos, intercalados con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[00138] En algunas realizaciones, un resto de unión de esta divulgación es un anticuerpo solo de cadena pesada. En algunas realizaciones, el dominio variable de un anticuerpo solo de cadena pesada tiene varias cadenas beta que están dispuestas en dos láminas. El dominio variable de un anticuerpo solo de cadena pesada contiene tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4. Las tres CDR del dominio variable (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son los bucles que conectan las cadenas beta B-C, C'-C'' y F-G del pliegue de inmunoglobulina, mientras que los bucles inferiores que conectan las hebras beta AB, CC', C''-D y E-F del pliegue de inmunoglobulina, y el bucle superior que conecta las cadenas D-E del pliegue de inmunoglobulina son los bucles no de CDR.

[00139] En algunas realizaciones de esta divulgación, al menos algunas o todas las secuencias de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 y FR4 son parte del "bucle no de CDR" de los restos de unión

descritos en el presente documento, tal como un resto de unión que es un anticuerpo solo de cadena pesada. En algunas realizaciones de esta divulgación, al menos algunos restos de aminoácidos de un dominio constante, CH1, CH2 o CH3, son parte del "bucle no de CDR" de los restos de unión descritos en el presente documento. Los bucles no de CDR comprenden, en algunas realizaciones, uno o más de bucles AB, CD, EF y DE de un dominio de conjunto C1 de una Ig o una molécula similar a Ig; bucles AB, CC', EF, FG, BC y EC' de un dominio de conjunto C2 de una Ig o una molécula similar a Ig; bucles DE, BD, GF, A(A1A2)B y EF de dominio de conjunto I(intermedio) de una Ig o molécula similar a Ig.

[00140] Dentro del dominio variable, se cree que las CDR son responsables del reconocimiento y la unión de antígenos, mientras que los restos de FR se consideran un armazón para las CDR. Sin embargo, en determinados casos, algunos de los restos de FR desempeñan un papel importante en el reconocimiento y unión de antígenos. Los restos de la región marco que afectan a la unión de Ag se dividen en dos categorías. Los primeros son restos de FR que entran en contacto con el antígeno, por lo tanto, son parte del sitio de unión, y algunos de estos restos están cerca en secuencia a las CDR. Otros restos son aquellos que están lejos de las CDR en secuencia pero están muy cerca de ellas en la estructura 3-D de la molécula, por ejemplo, un bucle en la cadena pesada.

[00141] En algunas realizaciones, el bucle no de CDR se modifica para generar un sitio de unión a antígeno específico para una proteína de suero en masa, tal como albúmina. En algunas realizaciones, el bucle no de CDR se modifica para generar un sitio de unión a antígeno específico para un dominio de unión a TROP2 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el bucle no de CDR se modifica para generar un sitio de unión a antígeno específico para un dominio de unión a CD3 como se describe en el presente documento.

[00142] Se contempla que se pueden usar diversas técnicas para modificar el bucle no de CDR, por ejemplo, mutagénesis dirigida, mutagénesis aleatoria, inserción de al menos un aminoácido que es extraño a la secuencia de aminoácidos de bucle no de CDR, sustitución de aminoácidos. Un péptido antigénico se inserta en un bucle no de CDR, en algunos ejemplos. En algunos ejemplos, un péptido antigénico se sustituye por el bucle no de CDR. La modificación, para generar un sitio de unión a antígeno, está en algunos casos en solo un bucle no de CDR. En otros casos, se modifica más de un bucle no de CDR. Por ejemplo, la modificación está en uno cualquiera de los bucles no de CDR que son AB, CC', C'D, EF y D-E. En algunos casos, la modificación está en el bucle DE. En otros casos, las modificaciones están en los cuatro bucles de AB, CC', C'D, E-F.

[00143] En determinados ejemplos, los restos de unión descritos en el presente documento se unen al dominio de unión a TROP2 a través de su bucle AB, CC', C' D o EF y se unen a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle BC, C'-C" o F-G. En determinados

ejemplos, el resto de unión se une al dominio de unión a TROP2 a través de su bucle AB, CC', C" D y EF y se une a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle BC, C'C" y FG. En determinados ejemplos, el resto de unión se une al dominio de unión a TROP2 a través de uno o más de los bucles AB, CC', C" D y E-F y se une a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de uno o más de los bucles BC, C'C" y FG. En determinados ejemplos, el resto de unión se une a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se une al dominio de unión a TROP2 a través de su bucle BC, C'C" o FG. En determinados ejemplos, el resto de unión se une a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle AB, CC', C" D y EF y se une al dominio de unión a TROP2 a través de su bucle BC, C'C" y FG. En determinados ejemplos, el resto de unión de la primera realización se une a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de uno o más de los bucles AB, CC', C" D y E-F y se une a la proteína de unión a TROP2, a través de uno o más de los bucles BC, C'C" y FG. En determinados ejemplos, los restos de unión descritos en el presente documento se unen a un dominio de unión a CD3 a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se unen a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle BC, C'-C" o F-G. En determinados ejemplos, los restos de unión descritos en el presente documento se unen a una proteína de suero en masa, tal como albúmina, a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se unen a un dominio de unión a CD3, a través de su bucle BC, C'-C" o F-G. En determinados ejemplos, los restos de unión descritos en el presente documento se unen a un dominio de unión a CD3 a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se unen a un dominio de unión a TROP2, a través de su bucle BC, C'-C" o F-G. En determinados ejemplos, los restos de unión descritos en el presente documento se unen a un dominio de unión a TROP2 a través de su bucle AB, CC', C" D o EF y se unen a un dominio de unión a CD3, a través de su bucle BC, C'-C" o F-G.

[00144] La proteína de suero en masa comprende, por ejemplo, albúmina, fibrinógeno o una globulina. En algunas realizaciones, los restos de unión son armazones diseñados por ingeniería. Los armazones diseñados por ingeniería comprenden, por ejemplo, sdAb, un scFv, un Fab, un VHH, un dominio de fibronectina de tipo III, armazón similar a inmunoglobulina (como se sugiere en Halaby *et al.*, 1999. *Prot Eng* 12(7):563-571), DARPin, péptido de nudo de cistina, lipocalina, armazón de haz de tres hélices, módulo de unión a albúmina relacionado con la proteína G, o un armazón de aptámero de ADN o ARN.

[00145] En algunos casos, los restos de unión comprenden un sitio de unión para la proteína de suero en masa. En algunas realizaciones, las CDR dentro de los restos de unión proporcionan un sitio de unión para la proteína de suero en masa. La proteína de suero en masa es, en algunos ejemplos, una globulina, albúmina, transferrina, IgG1, IgG2, IgG4, IgG3, monómero de IgA,

Factor XIII, Fibrinógeno, IgE o IgM pentamérica. En algunas realizaciones, los restos de unión comprenden un sitio de unión para una cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, las CDR proporcionan un sitio de unión para la cadena ligera de inmunoglobulina. La cadena ligera de inmunoglobulina es, en algunos ejemplos, una cadena ligera libre de Igκ o una cadena ligera libre de Igλ.

[00146] En realizaciones adicionales, los restos de unión son cualquier tipo de polipéptidos. Por ejemplo, en ciertos casos, los restos de unión son péptidos naturales, péptidos sintéticos o armazones de fibronectina, o proteínas de suero en masa modificadas por ingeniería. En algunos ejemplos, los restos de unión comprenden cualquier tipo de dominio de unión, incluyendo, pero sin limitación, dominios de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el resto de unión es un fragmento variable de cadena única (scFv), un fragmento de TCR soluble, un anticuerpo de dominio único tal como un dominio variable de cadena pesada (VH), un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable (VHH) de nanocuerpo derivado de camélido. En otras realizaciones, los restos de unión son dominios de unión no Ig, es decir, mimético de anticuerpos, tal como anticalinas, afilinas, moléculas affibody, AFFIMERS®, afitinas, alfacuerpos, avímeros, DARPINS®, finómeros, péptidos de dominio de Kunitz o monocuerpos.

[00147] Se contempla en el presente documento que el resto de unión descrito en el presente documento comprende al menos un enlazador escindible. En un aspecto, el enlazador escindible comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos reconocida y escindida de una manera específica de secuencia de aminoácidos. El resto de unión descrito en el presente documento, en algunos casos, comprende un enlazador escindible por proteasa reconocido y escindido de una manera específica de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador escindible de proteasa se reconoce de una manera específica de secuencia de aminoácidos por una metaloproteasa de matriz (MMP), por ejemplo, una MMP9. En algunos casos, el enlazador escindible por proteasa reconocido por una MMP9 comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos PR(S/T)(L/I)(S/T). En algunos casos, el enlazador escindible por proteasa reconocido por una MMP9 comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos LEATA. En algunos casos, el enlazador escindible por proteasa se reconoce de una manera específica de secuencia de aminoácidos por una MMP11.

[00148] Las proteasas son proteínas que escinden proteínas, en algunos casos, de una manera específica de secuencia de aminoácidos. Las proteasas incluyen, pero sin limitación, serina proteasas, cisteína proteasas, aspartato proteasas, treonina proteasas, proteasas de ácido glutámico, metaloproteasas, liasas peptídicas de asparagina, proteasas séricas, catepsinas, Catepsina B,

Catepsina C, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina K, Catepsina L, calicreínas, hK1, hK10, hK15, plasmina, collagenasa, collagenasa tipo IV, estromelisina, Factor Xa, proteasa similar a quimotripsina, proteasa similar a tripsina, proteasa similar a elastasa, proteasa similar a subtilisina, actinidaína, bromelaína, calpaína, caspasas, caspasa-3, Mir1-CP, papaína, proteasa HIV-1, proteasa de HSV, proteasa de CMV, quimosina, renina, pepsina, matriptasa, legumaína, plasmepsina, nepentesina, metaloexopeptidasas, metaloendopeptidasas, metaloproteasas de matriz (MMP), MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP13, MMP11, MMP14, activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), enterocinasas, antígeno específico de próstata (PSA, hK3), enzima convertidora de interleucina-1 β , trombina, FAP (FAP- α), dipeptidil peptidasa y dipeptidil peptidasa IV (DPPIV/CD26).

Tabla 1: Proteasas ilustrativas y secuencias de reconocimiento de proteasas

Proteasa	Secuencia de dominio de escisión	SEQ ID NO:
MMP7	KRALGLPG	551
MMP7	(DE) ₈ RPLALWRS(DR) ₈	552
MMP9	PR(S/T)(L/I)(S/T)	553
MMP9	LEATA	554
MMP11	GGAANLVRGG	555
MMP14	SGRIGFLRTA	556
MMP	PLGLAG	557
MMP	PLGLAX	558
MMP	PLGC(me)AG	559
MMP	ESPAYYTA	560
MMP	RLQLKL	561
MMP	RLQLKAC	562
MMP2, MMP9, MMP14	EP(Cit)G(Hof)YL	563
Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)	SGRSA	564
Activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA)	DAFK	565
Activador de plasminógeno de	GGGRR	566

Proteasa	Secuencia de dominio de escisión	SEQ ID NO:
uroquinasa (uPA)		
Enzima lisosomal	GFLG	567
Enzima lisosomal	ALAL	568
Enzima lisosomal	FK (IDENTIFICADOR DE SEQ A569)	
Catepsina B	NLL (IDENTIFICADOR DE SEQ A570)	
Catepsina D	PIC(Et)FF	571
Catepsina K	GGPRGLPG	572
Antígeno específico de próstata	HSSKLQ	573
Antígeno específico de próstata	HSSKLQL	574
Antígeno específico de próstata	HSSKLQEDA	575
Proteasa del virus del herpes simple	LVLASSSFGY	576
Proteasa de HIV	GVSQNYPIVG	577
Proteasa de CMV	GVVQASCRLA	578
Trombina	F(Pip)RS (IDENTIFICADOR DE SEQ A579)	
Trombina	DPRSFL	580
Trombina	PPRSFL	581
Caspasa-3	DEVD	582
Caspasa-3	DEVDP	583
Caspasa-3	KGSGDVEG	584
Enzima convertidora de interleucina 1 β	GWEHDG	585
Enterocinasa	EDDDDKA	586
PAF	KQEQNPGST	587
Calicreína 2	GKAFRR	588
plasmina	DAFK	589
plasmina	DVLK	590
plasmina	DAFK	591

Proteasa	Secuencia de dominio de escisión	SEQ ID NO:
TOP	ALLLALL	592

[00149] Se sabe que las proteasas son secretadas por algunas células y tejidos enfermos, por ejemplo, células tumorales o cancerosas, creando un microentorno rico en proteasas o un microentorno rico en proteasas. En algún caso, la sangre de un sujeto es rica en proteasas. En algunos casos, las células que rodean el tumor secretan proteasas en el microentorno tumoral. Las células que rodean las proteasas secretoras de tumor incluyen, pero sin limitación, las células del estroma tumoral, miofibroblastos, células sanguíneas, mastocitos, linfocitos B, células NK, linfocitos T reguladores, macrófagos, cytotoxic T lymphocytes, células dendríticas, células madre mesenquimatosas, células polimorfonucleares y otras células. En algunos casos, las proteasas están presentes en la sangre de un sujeto, por ejemplo, proteasas que se dirigen a secuencias de aminoácidos encontradas en péptidos microbianos. Esta característica permite que las terapias dirigidas, tales como las proteínas de unión a antígeno, tengan una especificidad adicional porque los linfocitos T no se unirán a la proteína de unión a antígeno, excepto en el microentorno rico en proteasas de las células o tejido diana. Otros ejemplos no limitantes de enlazadores que pueden utilizarse en construcciones descritas en el presente documento se proporcionan en el Listado de Secuencias a continuación.

Integración en receptores de antígenos quiméricos (CAR)

[00150] Las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación pueden, en determinados ejemplos, incorporarse en un receptor de antígeno quimérico (CAR) o en un ProCAR. Una célula efectora inmunitaria diseñada por ingeniería, por ejemplo, un linfocito T o linfocito NK, se puede usar para expresar un CAR que incluye una proteína de unión a TROP2 que contiene, por ejemplo, un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 como se describe en el presente documento. En una realización, el CAR que incluye la proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento está conectado a un dominio transmembrana a través de una región bisagra y, además, un dominio coestimulador, por ejemplo, un dominio de señalización funcional obtenido de OX40, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) o 4-1BB. En algunas realizaciones, el CAR comprende además una secuencia de aminoácidos que codifica un dominio de señalización intracelular, tal como 4-1BB y/o CD3 zeta. Las secuencias ilustrativas para un ProCAR que comprende un dominio de unión a TROP2 se proporcionan en SEQ ID NO: 1-57, o secuencias que son al menos aproximadamente 75 % a 100 % idénticas a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57, tal como aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idénticas a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 %.

[00151] Los receptores condicionalmente activos descritos en el presente documento comprenden al menos un resto de unión que comprende un bucle no de CDR. En un aspecto, el resto de unión enmascara la unión del dominio de unión a TROP2, hasta la activación. El enlazador escindible, por ejemplo, comprende un sitio de escisión de proteasa o un sitio de escisión dependiente del pH. El enlazador escindible, en determinados ejemplos, se escinde solo en un microambiente tumoral. Por lo tanto, el resto de unión, conectado al enlazador escindible, y unido adicionalmente al dominio de unión a TROP2, en algunos ejemplos, mantiene el dominio de unión a TROP2 en un estado inerte en circulación hasta que el enlazador escindible se escinde en un microentorno tumoral. En algunas realizaciones, el resto de unión se une al dominio de unión a TROP2. En algunas realizaciones, un bucle no de CDR proporciona un sitio de unión para la unión del resto al dominio de unión a TROP2. En algunas realizaciones, el resto de unión enmascara la unión del dominio de unión a TROP2 a su antígeno diana, *por ejemplo*, a través de oclusión estérica, a través de interacciones intramoleculares específicas, tales como interacciones dentro de los diferentes dominios del polipéptido que comprende el resto de unión. En algunas realizaciones, el resto de unión comprende además regiones determinantes complementarias (CDR).

[00152] En algunos casos, el resto de unión de un CAR o un proCAR como se describe en el presente documento es un dominio derivado de una molécula de inmunoglobulina (molécula de Ig), como se ha descrito anteriormente en la sección correspondiente a proteínas dirigidas a TROP2 multiespecíficas condicionalmente activas de esta divulgación.

[00153] En algunas realizaciones, el receptor condicionalmente activo comprende un dominio de unión a TROP2 (aTarget1), un enlazador escindible y un resto de unión (aTarget2). El dominio de unión a TROP2 tiene especificidad por una primera diana (TROP2), mientras que el resto de unión tiene especificidad por una segunda diana. El resto de unión también tiene un bucle no de CDR modificado, que inhibe la unión del dominio de unión a TROP2 a su diana. Una vez escindido en el enlazador escindible, el resto de unión puede liberarse, permitiendo la unión del dominio de unión a TROP2.

[00154] En algunas realizaciones, el receptor inactivo (ProCAR inactivo) comprende un dominio de unión a TROP2 (scFv o sdAb diana antitumoral) conectado a un resto de unión (sdAb anti-diana 2) a través de un enlazador que comprende un sitio de escisión de proteasa. El resto de unión comprende un péptido/resto de enmascaramiento, insertado en uno o más bucles no de CDR, de tal manera que el resto de unión se une e inhibe el dominio de unión al antígeno de TROP2. En algunas realizaciones, el resto de unión tiene especificidad por una diana dada, como se describe

adicionalmente en otra parte del presente documento. El receptor también comprende un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El receptor se proporciona en un linfocito T (CAR-T). Tras la exposición a un entorno tumoral, el sitio de escisión de proteasa es escindido por proteasas asociadas a tumores, activando así el receptor, generando el receptor activo que no comprende el resto de unión. El receptor comprende ahora un dominio de unión a antígeno activo. A medida que el receptor es internalizado por la célula, se generan nuevos receptores que comprenden el resto de unión y son inactivos.

[00155] El enlazador escindible del resto de unión, en algunas realizaciones, comprende un sitio escindible por proteasa similar a lo que se ha descrito anteriormente con respecto a las proteínas multiespecíficas condicionalmente activas que comprenden un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación. Por ejemplo, el enlazador escindible en algunas realizaciones comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias enlazadoras proporcionadas en la tabla de secuencias.

Dominio transmembrana

[00156] Los receptores de antígenos quiméricos condicionalmente activos, las proteínas de fusión del receptor de linfocitos T y los receptores de linfocitos T de la presente divulgación incluyen un dominio transmembrana para la inserción en una membrana celular eucariota. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se interpone entre el dominio de unión a TROP2 y el dominio intracelular. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana se interpone entre el dominio de unión a TROP2 y el dominio coestimulador.

[00157] Cualquier dominio transmembrana (TM) que proporcione la inserción de un polipéptido en la membrana celular de un eucariota (*por ejemplo*, mamífero) es adecuado para su uso. Como un ejemplo no limitante, se puede usar la secuencia de TM IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 551). Ejemplos no limitantes adicionales de secuencias de TM adecuadas incluyen, pero sin limitación, a) procedente de CD8 beta: GLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC (SEQ ID NO: 552); b) procedente de CD4: ALIVLGGVAGLLFIGLGIFFCVRC (SEQ ID NO: 553); c) procedente de CD3 zeta: LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV (SEQ ID NO: 554); d) procedente de CD28: WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 555); e) procedente de CD134 (OX40): AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL (SEQ ID NO: 556); y f) procedente de CD7: ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA (SEQ ID NO: 557).

Región bisagra

[00158] En algunos casos, los receptores de antígeno quimérico condicionalmente activos, las proteínas de fusión del receptor de linfocitos T y los receptores de linfocitos T de la presente divulgación comprenden una región bisagra (también denominada en el presente documento

"espaciador"), donde la región bisagra se interpone entre el dominio de unión a TROP2 y el dominio transmembrana. En algunos casos, la región bisagra es una región bisagra de cadena pesada de inmunoglobulina. En algunos casos, la región bisagra es un polipéptido de región bisagra derivado de un receptor (*por ejemplo*, una región bisagra procedente de CD8).

[00159] La región bisagra puede tener una longitud de aproximadamente 4 aminoácidos a aproximadamente 50 aminoácidos (aa), por ejemplo, de aproximadamente 4 aa a aproximadamente 10 aa, de aproximadamente 10 aa a aproximadamente 15 aa, de aproximadamente 15 aa a aproximadamente 20 aa, de aproximadamente 20 aa a aproximadamente 25 aa, de aproximadamente 25 aa a aproximadamente 30 aa, de aproximadamente 30 aa a aproximadamente 40 aa o de aproximadamente 40 aa a aproximadamente 50 aa.

[00160] Pueden seleccionarse fácilmente espaciadores adecuados y pueden tener cualquiera de una serie de longitudes adecuadas, tal como de 1 aminoácido (*por ejemplo*, Gly) a 20 aminoácidos, de 2 aminoácidos a 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, incluyendo de 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, de 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, de 6 aminoácidos a 8 aminoácidos o de 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos.

[00161] Los espaciadores ilustrativos incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)_n (SEQ ID NO: 514), (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 524) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 516), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles conocidos e la técnica. Pueden usarse polímeros de glicina y de glicina-serina; tanto Gly como Ser están relativamente desestructuradas y, por lo tanto, pueden servir como anclaje neutro entre componentes. Pueden usarse polímeros de glicina; la glicina tiene acceso a un espacio phi-psi significativamente mayor incluso que la alanina y está menos restringida que los restos con cadenas laterales más largas (véase, Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Los espaciadores ilustrativos comprenden secuencias de aminoácidos que incluyen, pero sin limitación, GGSG (SEQ ID NO: 525), GGSGG (SEQ ID NO: 526), GSGSG (SEQ ID NO: 527), GSGGG (SEQ ID NO: 528), GGGSG (SEQ ID NO: 529), GSSSG (SEQ ID NO: 530) y similares.

[00162] Se conocen en la técnica secuencias de aminoácidos de regiones bisagra de inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Tan *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 162; y Huck *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 1779. Como ejemplos no limitantes, una región bisagra de inmunoglobulina puede incluir una de las siguientes secuencias de aminoácidos: DKTHT; CPPC; CPEPKSCDTPPPCPR; (véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280:41494); ELKTPLGDTTHT; KSCDKTHTCP; KCCVDCP; KYGPPCP; EPKSCDKTHTCPPCP; bisagra de

IgG1 humana; ERKCCVECPPCP; bisagra de IgG2 humana); ELKTPLGDTTHTCPRCP; bisagra de IgG3 humana; SPNMVPHAHHAQ; bisagra de IgG4 humana); y similares.

[00163] En algunas realizaciones, la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. La región bisagra puede incluir una o más sustituciones y/o inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos en comparación con una región bisagra de tipo silvestre (de origen natural). Por ejemplo, puede sustituirse His229 de la bisagra de IgG1 humana por Tyr, de modo que la región bisagra comprende la secuencia EPKSCDKTYTCPPCP; véase, por ejemplo, Yan *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.* 287:5891.

[00164] En algunas realizaciones, la región bisagra comprende una secuencia de aminoácidos derivada de CD8 humano; por ejemplo, la región bisagra comprende la secuencia de aminoácidos: TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO:), o una variante de la misma.

Receptores de antígeno quimérico condicionalmente activos

[00165] En una realización, la divulgación proporciona un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo (CAR). Un CAR generalmente comprende múltiples dominios, incluyendo un dominio de unión a antígeno diana, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. El CAR condicionalmente activo de la presente divulgación comprende múltiples dominios, incluyendo un resto de unión, un dominio de unión a antígeno diana que se une a TROP2, un dominio transmembrana y un dominio de señalización intracelular. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular es un dominio de señalización de una proteína que incluye, pero sin limitación, ZAP70, CD3 zeta y 4-1BB.

[00166] En algunas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo comprende además un dominio coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína que incluye, pero sin limitación, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), y secuencias de aminoácidos de los mismos que tienen al menos uno, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones del mismo.

[00167] En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de una proteína que incluye, pero sin limitación, una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, una cadena zeta de TCR, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma, una subunidad de TCR CD3 delta, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionales de las mismas y secuencias de aminoácidos de las mismas que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones de los mismos.

[00168] En un aspecto, la divulgación proporciona una célula (*por ejemplo*, linfocito T) diseñada para expresar un CAR. En un aspecto, una célula se transforma con el CAR y el CAR se expresa en la superficie celular. En algunas realizaciones, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transduce con un vector viral que codifica un CAR. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector lentivírico. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar de manera estable el CAR. En otra realización, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transfecta con un ácido nucleico, *por ejemplo*, ARNm, ADNc, ADN, codificando un CAR. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar transitoriamente el CAR.

Proteínas de fusión de receptor de linfocitos T condicionalmente activas

[00169] En una realización, la divulgación proporciona una proteína de fusión de receptor de linfocitos T condicionalmente activa. Como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión de receptor de linfocitos T (TCR)" o "TFP" incluye un polipéptido recombinante derivado de los diversos polipéptidos que comprenden el TCR que generalmente es capaz de i) unirse a un antígeno de superficie en las células diana e ii) interactuar con otro polipéptido componentes del complejo TCR intacto, típicamente cuando se ubican conjuntamente en o sobre la superficie de un linfocito T.

[00170] La TFP condicionalmente activa comprende un resto de unión, un dominio de unión a TROP2 y una subunidad de receptor de linfocitos T. En algunas realizaciones, la subunidad del receptor de linfocitos T comprende además al menos una porción de un dominio extracelular del receptor de linfocitos T, un dominio transmembrana y un dominio intracelular del receptor de linfocitos T. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana de una proteína que incluye, pero sin limitación, una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, una cadena zeta de TCR, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma, una subunidad de TCR CD3 delta, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionales de los mismos o secuencias de aminoácidos de los mismos que tienen al menos uno, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones del mismo.

[00171] En algunas realizaciones, el dominio intracelular del receptor de linfocitos T comprende un dominio estimulador. El dominio estimulador puede ser de la subunidad del receptor de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitación, la subunidad beta, subunidad alfa, subunidad delta, subunidad gamma, subunidad épsilon, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el dominio estimulador comprende un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) o porción del mismo que incluye, pero sin limitación, subunidad de TCR CD3 zeta,

subunidad de TCR CD3 épsilon, subunidad de TCR CD3 gamma, subunidad de TCR CD3 delta, cadena zeta de TCR, cadena 1 del receptor Fc épsilon, cadena 2 del receptor Fc épsilon, cadena 1 del receptor Fc gamma, cadena 2a del receptor Fc gamma, cadena 2b1 del receptor Fc gamma, cadena 2b2 del receptor Fc gamma, cadena 3a del receptor Fc gamma, cadena 3b del receptor Fc gamma, cadena 1 del receptor Fc beta, TYROBP (DAP12), CDS, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, fragmentos funcionales de los mismos y secuencias de aminoácidos de los mismos que tienen al menos uno, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones del mismo.

[00172] En algunas realizaciones, la TFP condicionalmente activa comprende además un dominio coestimulador. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína que incluye, pero sin limitación, OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), y secuencias de aminoácidos de los mismos que tienen al menos uno, dos o tres modificaciones, pero no más de 20, 10 o 5 modificaciones del mismo.

[00173] En algunas realizaciones, el dominio de unión a TROP2 está conectado al dominio extracelular del receptor de linfocitos T mediante una secuencia enlazadora. En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende (G₄S)_n, en donde n = 1 a 4 (SEQ ID NO: 531). En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende una secuencia enlazadora larga (LL). En algunos casos, la secuencia enlazadora larga codificada comprende (G₄S)_n, en donde n = 2 a 4 (SEQ ID NO: 532). En algunos casos, la secuencia enlazadora codificada comprende una secuencia enlazadora corta (SL). En algunos casos, la secuencia enlazadora corta codificada comprende (G₄S)_n, en donde n = 1 a 3 (SEQ ID NO: 533).

[00174] En un aspecto, la divulgación proporciona una célula (*por ejemplo*, linfocito T) diseñada para expresar una proteína de fusión de receptor de linfocito T (TFP) condicionalmente activa. En un aspecto, una célula se transforma con la TFP condicionalmente activa y la TFP condicionalmente activa se expresa en la superficie celular. En algunas realizaciones, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transduce con un vector viral que codifica una TFP condicionalmente activa. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector lentivírico. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar de manera estable la TFP condicionalmente activa. En otra realización, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transfecta con un ácido nucleico, *por ejemplo*, ARNm, ADNc, ADN, codificando una TFP condicionalmente activa. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar transitoriamente la TFP condicionalmente activa.

Receptores de linfocitos T condicionalmente activos

[00175] En una realización, la divulgación proporciona un receptor de linfocitos T condicionalmente activo. Un receptor de linfocitos T generalmente comprende múltiples subunidades, incluyendo subunidades alfa, beta, delta, gamma, épsilon y zeta. El receptor de linfocitos T condicionalmente activo de la presente divulgación comprende un resto de unión. En algunas realizaciones, el resto de unión se une a una subunidad de receptor de linfocitos T que incluye, pero sin limitación, la subunidad alfa, la subunidad beta, o una combinación de las mismas.

[00176] En algunas realizaciones, el resto de unión es capaz de enmascarar, o enmascara, la unión del receptor de linfocitos T a su diana. En algunas realizaciones, el resto de unión se une al receptor de linfocitos T. En algunas realizaciones, un bucle no de CDR proporciona un sitio de unión para la unión del resto al receptor de linfocitos T. En algunas realizaciones, el bucle no de CDR proporciona un sitio de unión específico para el receptor de linfocitos T alfa, receptor de linfocitos T beta, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el resto de unión enmascara la unión del receptor de linfocitos T a su diana, *por ejemplo*, a través de oclusión estérica, a través de interacciones intermoleculares específicas.

[00177] En un aspecto, la divulgación proporciona una célula (*por ejemplo*, linfocito T) diseñada para expresar un receptor de linfocitos T (TCR) activo. En un aspecto, una célula se transforma con la TCR condicionalmente activa y la TCR condicionalmente activa se expresa en la superficie celular. En algunas realizaciones, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transduce con un vector viral que codifica una TCR condicionalmente activa. En algunas realizaciones, el vector viral es un vector retroviral. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector lentivírico. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar de manera estable la TCR condicionalmente activa. En otra realización, la célula (*por ejemplo*, linfocito T) se transfecta con un ácido nucleico, *por ejemplo*, ARNm, ADNc, ADN, codificando una TCR condicionalmente activa. En algunas de dichas realizaciones, la célula puede expresar transitoriamente la TCR condicionalmente activa.

Células

[00178] En una realización, la presente divulgación proporciona una célula que comprende el receptor de antígeno quimérico o el receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, proteína de fusión de receptor de linfocitos T condicionalmente activo o receptor de linfocitos T condicionalmente activo de la presente divulgación. La célula puede ser una célula de mamífero.

[00179] Las células de mamífero adecuadas incluyen células primarias y líneas celulares inmortalizadas. Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares humanas, líneas celulares de primate no humano, roedor (*por ejemplo*, ratón, rata) líneas celulares y similares. Las líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero sin limitación, células HeLa (*por*

ejemplo, Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) n.º CCL-2), células CHO (*por ejemplo*, ATCC N.º CRL9618, CCL61, CRL9096), células 293 (*por ejemplo*, ATCC n.º CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (*por ejemplo*, ATCC n.º CRL-1658), células Huh-7, células BHK (*por ejemplo*, ATCC n.º CCL10), células PC12 (ATCC N.º CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC N.º CRL1651), células RAT1, linfocitos L de ratón (ATCC N.º CCLI.3), células de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC N.º CRL1573), células HLHepG2, HuT-78, Jurkat, HL-60, líneas celulares NK (*por ejemplo*, NKL, NK92 e YTS) y similares.

[00180] En algunos casos, la célula no es una línea celular immortalizada, sino que es una célula (*por ejemplo*, una célula primaria) obtenida de un individuo. Por ejemplo, en algunos casos, la célula es una célula inmunitaria obtenida de un individuo. Como ejemplo, la célula es un linfocito T obtenido de un individuo. Como otro ejemplo, la célula es una célula citotóxica obtenida de un individuo. Como otro ejemplo, la célula es una célula madre o una célula progenitora obtenida de un individuo.

[00181] En estudios recientes, las construcciones de CAR se han utilizado para dirigir la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK), revisado por Hermanson & Kaufman (2015, *Front Immunol* 6:195) y Carlsten & Childs (2015, *Front Immunol* 6:266). Similar a los linfocitos T, las células NK pueden transfectarse con construcciones de expresión de CAR y usarse para inducir una respuesta inmunitaria. Debido a que las células NK no requieren coincidencia de HLA, pueden usarse como células efectoras alogénicas (Harmanson & Kaufman, 2015). También, las células NK de sangre periférica (PB-NK), de uso para la terapia, pueden aislarse de los donantes mediante una simple extracción de sangre. Las construcciones de uso de CAR pueden contener elementos similares a los usados para preparar linfocitos T-CAR.

[00182] Como tal, en algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una célula que comprende una célula NK que comprende el receptor de antígeno quimérico, el receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, proteína de fusión de receptor de linfocitos T condicionalmente activo o receptor de linfocitos T condicionalmente activo de la presente divulgación.

[00183] Como se ha analizado anteriormente en el contexto de una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa (*por ejemplo*, una TROP2 ProTriTAC), en algunas realizaciones, un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo como se describe en el presente documento tiene un índice terapéutico mejorado en comparación con el de un receptor de antígeno quimérico que comprende el mismo dominio de unión a TROP2 que la variante condicionalmente activa, pero es constitutivamente activo en lugar de ser condicionalmente activo. Por ejemplo, una TROP2 ProCAR, en algunas realizaciones, tiene un índice terapéutico aumentado que un TROP2

CAR. El aumento, en algunas realizaciones, es de al menos aproximadamente 2 veces a aproximadamente 1000 veces, tal como de aproximadamente 4 veces a aproximadamente 800 veces, de aproximadamente 6 veces a aproximadamente 800 veces, de aproximadamente 6 veces a aproximadamente 600 veces, de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 400 veces, de aproximadamente 20 veces a aproximadamente 200 veces, de aproximadamente 30 veces a aproximadamente 150 veces, de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces. El aumento en el índice terapéutico, en algunas realizaciones, se atribuye a la conjugación del dominio de unión a TROP2 a un resto de unión como se ha descrito anteriormente, con el bucle no de CDR y el enlazador escindible.

Métodos de generación de una célula que comprende un receptor condicionalmente activo

[00184] La presente divulgación proporciona un método para generar una célula que comprende un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, proteína de fusión de receptor de linfocitos T o receptor de linfocitos T. El método generalmente implica modificar genéticamente una célula de mamífero con un vector de expresión o un ARN (*por ejemplo*, ARN transcrito *in vitro*), que comprende secuencias de nucleótidos que codifican un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, proteína de fusión de receptor de linfocitos T o receptor de linfocitos T de la presente divulgación. La modificación genética puede llevarse a cabo *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*. La célula puede ser, *por ejemplo*, una célula inmunitaria (*por ejemplo*, un linfocito T o una célula NK), una célula madre o una célula progenitora.

[00185] En algunos casos, la modificación genética se lleva a cabo *ex vivo*. Por ejemplo, un linfocito T, una célula madre o una célula NK se obtienen de un individuo; y la célula obtenida del individuo se modifica genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, proteína de fusión de receptor de linfocitos T o receptor de linfocitos T de la presente divulgación.

Fuentes de linfocitos T

[00186] En algunas realizaciones, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. El término "sujeto", como se usa a lo largo de esta divulgación, pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria (*por ejemplo*, mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Los linfocitos T se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T alogénicos (*por ejemplo*, linfocitos T CAR derivados de donantes alogénicos), linfocitos citolíticos naturales (*por ejemplo*, linfocitos citolíticos naturales derivados de donante), células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas

realizaciones de la presente divulgación, puede usarse cualquiera de varias líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, los linfocitos T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquiera de varias técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como la separación FICOLL™. En una realización, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos sanguíneos nucleados, eritrocitos, y plaquetas. En una realización, las células recogidas mediante aféresis se lavan para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En una realización de la divulgación, se lavaron células con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no de todos, los cationes divalentes. Las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a una activación aumentada. Como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, una etapa de lavado se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, como mediante el uso de una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, the Baxter CytoMate o Haemonetics Cell Saver 5) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tal como, por ejemplo, libre de Ca, PBS sin Mg, PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células resuspenderse directamente en medios de cultivo.

[00187] En una realización, los linfocitos T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contraflujo. Una subpoblación específica de linfocitos T, tal como linfocitos T CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y CD45RO+, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en una realización, los linfocitos T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (*por ejemplo*, 3×28), tal como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T. En una realización, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo oscila de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En una realización adicional, el período de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otra realización más, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En una realización, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Se pueden usar tiempos de incubación más prolongados para aislar linfocitos T en

cualquier situación donde haya pocos linfocitos T en comparación con otros tipos de células, como el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados puede aumentar la eficiencia de captura de linfocitos T CD8+. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas con respecto a linfocitos T (como se describe más adelante en el presente documento), las subpoblaciones de linfocitos T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de linfocitos T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados. También se pueden usar múltiples rondas de selección en el contexto de esta divulgación. En determinadas realizaciones, puede ser conveniente realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a rondas de selección adicionales.

[00188] El enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer las células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En determinadas realizaciones, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente los linfocitos T reguladores que típicamente expresan CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+ y FoxP3+. Como alternativa, en determinadas realizaciones, los linfocitos T reguladores se agotan mediante perlas conjugadas anti-CD25 u otro método de selección similar.

[00189] En una realización, se puede seleccionar una población de linfocitos T que exprese uno o más de IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzima B y perforina u otras moléculas apropiadas, por ejemplo, otras citocinas. Se pueden determinar métodos para el cribado de la expresión celular, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la publicación PCT n.º WO 2013/126712.

[00190] Para el aislamiento de una población de células deseada mediante selección positiva o negativa, la concentración de células y superficie (*por ejemplo*, partículas tales como perlas)

pueden variar. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (*por ejemplo*, incrementar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se utiliza una concentración de 1 mil millones de células/ml. En una realización adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Aún en una realización, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como linfocitos T CD28 negativos, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (*por ejemplo*, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[00191] En otra realización, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y de superficie (*por ejemplo*, partículas tal como cuentas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4+ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficiente que los linfocitos T CD8+ en concentraciones diluidas. En una realización, la concentración de células usada es 5×10^6 /ml. En otras realizaciones, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml y cualquier valor entero intermedio. En otras realizaciones, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables, ya sea entre 2-10 °C o a temperatura ambiente.

[00192] Los linfocitos T para estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien en la técnica se conocen muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene el 20 % de DMSO y el 8 % de albúmina sérica humana, o medios de cultivo que contienen el 10 % de dextrano 40 y el 5 % de dextrosa, el 20 % de albúmina

sérica humana y el 7,5 % de DMSO, o el 31,25 % de Plasmalyte-A, el 31,25 % de dextrosa al 5 %, NaCl al 0,45 %, el 10 % de dextrano 40 y el 5 % de dextrosa, el 20 % de albúmina sérica humana y el 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación de células adecuados que contengan, por ejemplo, Hespan y PlasmaLyte A, las células se congelan a continuación a -80 °C a una velocidad de 1 °C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación incontrolada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido. En determinadas realizaciones, las células criopreservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los métodos de la presente divulgación.

[00193] También se contempla en el contexto de la divulgación la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en que podrían necesitarse las células expandidas como se describe en el presente documento. Como tal, la fuente de las células que se van a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario y las células deseadas, tales como linfocitos T, se aíslan y se congelan para su uso posterior en la terapia con linfocitos T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con linfocitos T, tales como los descritos en el presente documento. En una realización, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En determinadas realizaciones, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no ha desarrollado una enfermedad, y las células de interés se aíslan y congelan para su uso posterior. En determinadas realizaciones, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En determinadas realizaciones, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En una realización adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento con agentes tales como natalizumab, efalizumab, agentes antivíricos, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tal como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxano, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación.

[00194] En una realización adicional de la presente divulgación, los linfocitos T se obtienen de un paciente directamente después del tratamiento que deja al sujeto con linfocitos T funcionales. En este sentido, se ha observado que tras determinados tratamientos de cáncer, en particular

tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o puede mejorarse por su capacidad de expandirse *ex vivo*. De manera análoga, tras la manipulación *ex vivo* utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para mejorar el injerto y la expansión *in vivo*. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente divulgación recoger células sanguíneas, incluyendo linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinadas realizaciones, se pueden usar regímenes de movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en donde se favorece la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante un período de tiempo definido después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Activación y expansión de linfocitos T

[00195] Los linfocitos T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos N.º 6.352.694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; y la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20060121005 A1.

[00196] Generalmente, los linfocitos T de la divulgación pueden expandirse por contacto con una superficie que se ha unido a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diación, Besancon, Francia), pueden utilizarse al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (Berg *et al.*, *Transplant*

Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328, 1999; Garland *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 227(1-2):53-63, 1999).

[00197] En determinadas realizaciones, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para el linfocito T pueden proporcionarse mediante protocolos diferentes. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acopla a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (*es decir*, en formación "cis") o a superficies separadas (*es decir*, en formación de "trans"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En una realización, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinadas realizaciones, ambos agentes pueden estar en solución. En una realización, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticulados a una superficie, como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes. En este sentido, véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 20040101519 A1 y US 20060034810 A1 para células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T en la presente divulgación.

[00198] En una realización, los dos agentes están inmovilizados sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o a perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes están coinmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En una realización, se usa una relación de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de linfocitos T CD4+ y el crecimiento de linfocitos T. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, se usa una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de tal manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una realización particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una realización, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros intermedios. En una realización de la presente divulgación, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor de uno. En ciertas realizaciones de la divulgación, la relación de anticuerpo anti CD28 a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es superior a 2:1. En una realización particular, se utiliza una

relación de CD3:CD28 de 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En una realización, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En una realización adicional, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En una realización, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En una realización, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:10 de anticuerpo unido a perlas. En una realización, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:3 de anticuerpo unido a las perlas. Aún en una realización, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 3:1 de anticuerpo unido a las perlas.

[00199] Se pueden usar relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular los linfocitos T u otras células diana. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la materia, la relación entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo pueden unir unas pocas células, mientras que perlas más grandes podrían unir muchas. En determinadas realizaciones, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y en realizaciones adicionales la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio, también puede usarse para estimular linfocitos T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de los linfocitos T, puede variar como se señaló anteriormente, sin embargo, determinados valores incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, siendo una relación preferida al menos 1:1 partículas por linfocito T. En una realización, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En una realización particular, la relación partícula:célula es 1:5. En realizaciones adicionales, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en una realización, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o cada dos días a partir de entonces durante hasta 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basándose en el recuento de células el día de la adición). En una realización particular, la relación de partículas a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En una realización, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En una realización, la relación de partículas a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En una realización, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que pueden ser adecuados una variedad de otras relaciones para su uso en la presente divulgación. En

particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

[00200] En realizaciones adicionales de la presente divulgación, las células, tales como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las células y las perlas recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. En una realización adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, como una fuerza magnética, lo que da como resultado un aumento de unión de marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

[00201] A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden unirse permitiendo que perlas paramagnéticas a las que están unidos anti-CD3 y anti-CD28 (3×28 perlas) entren en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 linfocitos T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, por ejemplo, PBS (sin cationes divalentes tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o la muestra completa (es decir, 100 %) puede comprender la célula diana de interés. En consecuencia, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinadas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (*es decir*, incrementar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en una realización, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En una realización, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Aún en una realización, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un mayor rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como los linfocitos T CD28 negativos. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en determinadas realizaciones. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

[00202] En una realización de la presente divulgación, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario intermedio. En una realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. En una realización de la divulgación, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En una realización, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (*por ejemplo*, Minimal Essential Media o RPMI Media 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad, incluyendo suero (*por ejemplo*, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, Plasmanate y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o suplementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para favorecer el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (*por ejemplo*, 37 °C) y la atmósfera (*por ejemplo*, aire más 5 % de CO₂).

[00203] Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos de células mononucleares de sangre o de sangre periférica aférica tienen una población de linfocitos T cooperadores (TH, CD4+) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (TC, CD8+). La expansión *ex vivo* de los linfocitos T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos TH, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de linfocitos TC.

Modificaciones de la proteína de unión a TROP2

[00204] Las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento, incluyendo dominios de unión a TROP2 (*por ejemplo*, un sdAb de unión a TROP2 de esta divulgación) y proteínas multiespecíficas dirigidas a TROP2 (*por ejemplo*, una proteína triespecífica o protriespecífica dirigida a TROP2 como se describe en el presente documento) abarca derivados o análogos en los

que (i) un aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que no está codificado por el código genético, (ii) el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como polietilenglicol o (iii) se fusionan aminoácidos adicionales con la proteína, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de aminoácidos para la purificación de la proteína.

[00205] Las modificaciones típicas incluyen, pero sin limitación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, la formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

[00206] Las modificaciones se realizan en cualquier parte de las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Ciertas modificaciones peptídicas comunes que son útiles para la modificación de las proteínas de unión a TROP2 incluyen glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación, bloqueo del grupo amino o carboxilo en un polipéptido o de ambos, por una modificación covalente y ADP-ribosilación.

[00207] En algunas realizaciones, los derivados de las proteínas de unión a TROP2 como se describen en el presente documento comprenden derivados de moduladores inmunorreactivos y moléculas de unión a antígeno que comprenden una o más modificaciones.

[00208] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación son monovalentes o multivalentes bivalentes, trivalentes, etc.). Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de sitios de unión diana potenciales asociados con un anticuerpo. Cada sitio de unión a diana se une específicamente a una molécula diana o posición específica o locus en una molécula diana. Cuando un anticuerpo es monovalente, cada sitio de unión de la molécula se unirá específicamente a una única posición de antígeno o epítipo. Cuando un anticuerpo comprende más de un sitio de unión a diana (multivalente), cada sitio de unión a diana puede unirse específicamente a las mismas o diferentes moléculas (*por ejemplo*, pueden unirse a diferentes ligandos o diferentes antígenos, o diferentes epítopos o posiciones en el mismo antígeno).

[00209] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 como se ha expuesto anteriormente se fusionan a una región Fc de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitación, inmunoglobulina humana, tal como IgG1 humano, una IgG2 humana, una IgG3 humana, IgG4 humana, para generar proteínas de unión a TROP2 de fusión con Fc. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de fusión con Fc de esta divulgación tienen una semivida extendida en comparación con una proteína de unión a TROP2 idéntica. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de fusión con Fc de esta divulgación contienen *entre otras cosas* una o más sustituciones de restos de aminoácidos adicionales, mutaciones y/o modificaciones, por ejemplo, en la región Fc, que dan como resultado una proteína de unión con características preferidas que incluyen, pero sin limitación, farmacocinética alterada, semivida sérica prolongada, etc.

[00210] En algunas realizaciones, tales proteínas de unión a TROP2 fusionadas con Fc proporcionan semividas extendidas en un mamífero, tal como en un ser humano, de más de 5 días, más de 10 días, más de 15 días, más de 20 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses o más de 5 meses. El aumento de la semivida, en algunos casos, da como resultado un título sérico más alto que reduce así la frecuencia de la administración de las proteínas de unión a TROP2 y/o reduce la concentración de los anticuerpos que se van a administrar. La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión a alta afinidad de FcRn humano se analiza, en algunos ejemplos, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante.

[00211] Las proteínas de unión a TROP2, en algunos casos, se modifican diferencialmente durante o después de la producción, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, enlace a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se lleva a cabo mediante técnicas, que incluyen, pero sin limitación, la escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

[00212] Diversas modificaciones postraduccionales de las proteínas de unión a TROP2 también abarcadas por la divulgación incluyen, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono unidas por N o unidas por O, procesamiento de extremos N-terminal o C-terminal, unión de restos químicos a la cadena principal de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono unidas por N o unidas por O, y adición o delección de un resto de metionina N-terminal como resultado de la expresión de células hospedadoras procarióticas. Además, las proteínas de unión a

TROP2, en algunos casos, se modifican con una etiqueta detectable, tal como una etiqueta enzimática, fluorescente, radioisotópica o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento del modulador.

Polinucleótidos que codifican proteínas de unión a TROP2

[00213] También se proporcionan, en algunas realizaciones, moléculas de polinucleótidos que codifican proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, las moléculas de polinucleótidos se proporcionan como una construcción de ADN. En otras realizaciones, las moléculas de polinucleótidos se proporcionan como un transcrito de ARN mensajero.

[00214] Las moléculas de polinucleótidos se construyen mediante métodos conocidos tales como combinando los genes que codifican una proteína de unión a TROP2 de dominio único o el gen que codifica diversos dominios de proteínas de unión a TROP2 que comprenden más de un dominio. En algunas realizaciones, el gen que codifica los dominios está separado por conectores peptídicos o, en otras realizaciones, directamente enlazado mediante un enlace peptídico, en una construcción genética individual unida operativamente a un promotor adecuado y opcionalmente a un terminador de transcripción adecuado y expresarla en una bacteria u otro sistema de expresión adecuado, tal como, por ejemplo, células CHO. Dependiendo del sistema de vector y el hospedador utilizados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluidos los promotores constitutivos e inducibles. El promotor se selecciona de modo que dirige la expresión del polinucleótido en la célula hospedadora respectiva.

[00215] En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento se inserta en un vector, preferentemente un vector de expresión, que representa una realización adicional. Este vector recombinante puede construirse de acuerdo con métodos conocidos. Entre los vectores de interés particular se incluyen plásmidos, fagémidos, derivados de fagos, virus (*por ejemplo*, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus herpes, lentivirus y similares) y cósmidos.

[00216] Puede utilizarse una variedad de sistemas de expresión vector/hospedador para contener y expresar el polinucleótido que codifica el polipéptido de la proteína de unión a TROP2 descrita. Ejemplos de vectores de expresión para la expresión en *E. coli* son pSKK (Le Gall *et al.*, *J Immunol Métodos*. (2004) 285(1):111-27) o pcDNA5 (Invitrogen) para la expresión en células de mamífero.

Por lo tanto, las proteínas de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, se producen introduciendo un vector que codifica la proteína como se ha descrito anteriormente en una célula hospedadora y cultivando dicha célula hospedadora en

condiciones de modo que se expresen los dominios de proteína, puedan aislarse y, opcionalmente, además purificarse.

Composiciones farmacéuticas

[00217] También se proporciona, en algunas realizaciones, composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión anti-TROP2 descrita en el presente documento, un vector que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de las proteínas de unión a TROP2 o una célula hospedadora transformada por este vector y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye, pero sin limitación, cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no sea tóxico para el paciente a la que se administra. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. Preferentemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos. Una realización adicional proporciona una o más de las proteínas de unión a TROP2 descritas anteriormente empaquetadas en forma liofilizada o empaquetadas en un medio acuoso.

[00218] En algunas realizaciones de las composiciones farmacéuticas, las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento están encapsuladas en nanopartículas. En algunas realizaciones, las nanopartículas son fulerenos, cristales líquidos, liposoma, puntos cuánticos, nanopartículas supermagnéticas, dendrímeros o nanorods. En otras realizaciones de las composiciones farmacéuticas, la proteína de unión a TROP2 se une a liposomas. En algunos casos, las proteínas de unión a TROP2 se conjugan a la superficie de liposomas. En algunos casos, las proteínas de unión a TROP2 se encapsulan dentro de la cubierta de un liposoma. En algunos casos, el liposoma es un liposoma catiónico.

[00219] Las proteínas de unión a TROP2 descritas en el presente documento se contemplan para su uso como medicamento. La administración se efectúa por diferentes vías, *por ejemplo* mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. En algunas realizaciones, la vía de administración depende del tipo de terapia y del tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación se determinará por el médico responsable y otros factores clínicos. Las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área superficial del cuerpo, la edad, el sexo, la

composición a administrar en particular, tiempo y vía de administración, el tipo de terapia, salud general y otros fármacos que se hayan administrado al mismo tiempo. Una "dosis eficaz" se refiere a las cantidades del principio activo que son suficientes para afectar al recorrido y la gravedad de la enfermedad, conduciendo a la reducción o la remisión de tal patología y puede determinarse usando métodos conocidos.

[00220] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se administran a una dosis de hasta 10 mg/kg con una frecuencia de una vez por semana. En algunos casos, la dosificación varía de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 70 ng/kg. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 1 ng/kg a aproximadamente 10 ng/kg, de aproximadamente 5 ng/kg a aproximadamente 15 ng/kg, de aproximadamente 12 ng/kg a aproximadamente 20 ng/kg, de aproximadamente 18 ng/kg a aproximadamente 30 ng/kg, de aproximadamente 25 ng/kg a aproximadamente 50 ng/kg, de aproximadamente 35 ng/kg a aproximadamente 60 ng/kg, de aproximadamente 45 ng/kg a aproximadamente 70 ng/kg, de aproximadamente 65 ng/kg a aproximadamente 85 ng/kg, de aproximadamente 80 ng/kg a aproximadamente 1 µg/kg, de aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 5 µg/kg, de aproximadamente 2 µg/kg a aproximadamente 10 µg/kg, de aproximadamente 7 µg/kg a aproximadamente 15 µg/kg, de aproximadamente 12 µg/kg a aproximadamente 25 µg/kg, de aproximadamente 20 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg, de aproximadamente 20 µg/kg a aproximadamente 60 µg/kg, de aproximadamente 35 µg/kg a aproximadamente 70 µg/kg, de aproximadamente 45 µg/kg a aproximadamente 80 µg/kg, de aproximadamente 65 µg/kg a aproximadamente 90 µg/kg, de aproximadamente 85 µg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,095 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 20 µg/kg a 540 µg/kg. En algunos casos, la dosificación es de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,2 mg/kg; de aproximadamente 0,25 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,45 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, de aproximadamente 0,75 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de aproximadamente 5,5 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg, de aproximadamente 6,5 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg, de aproximadamente 7,5 mg/kg a aproximadamente 9 mg/kg, o de aproximadamente 8,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación se administran a una dosificación de 1 ng/kg, 2 ng/kg, 5 ng/kg, 10 ng/kg, 20 ng/kg, 30 ng/kg, 40 ng/kg, 50 ng/kg, 60 ng/kg, 60 ng/kg, 70 ng/kg, 80 ng/kg, 90 ng/kg, 100 ng/kg, 200 ng/kg, 300 ng/kg, 400 ng/kg, 500 ng/kg, 600 ng/kg, 700 ng/kg, 800 ng/kg,

900 ng/kg, 1 µg/kg, 2 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 12 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 22,5 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 50 µg/kg, 60 µg/kg, 70 µg/kg, 80 µg/kg, 90 µg/kg, 100 µg/kg, 130 µg/kg, 150 µg/kg, 180 µg/kg, 200 µg/kg, 225 µg/kg, 250 µg/kg, 280 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 370 µg/kg, 400 µg/kg, 430 µg/kg, 460 µg/kg, 500 µg/kg, 540 µg/kg, 590 µg/kg, 600 µg/kg, 630 µg/kg, 670 µg/kg, 700 µg/kg, 730 µg/kg, 780 µg/kg, 800 µg/kg, 840 µg/kg, 900 µg/kg, 950 µg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg o 10 mg/kg una vez cada semana. La frecuencia de administración, en algunas realizaciones, es aproximadamente menos que diariamente, cada dos días, menos de una vez al día, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada 7 días, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o una vez al mes. En algunos casos, la frecuencia de administración es semanal. En algunos casos, la frecuencia de administración es semanal y la dosificación es de hasta 10 mg/kg. En algunos casos, la duración de la administración es de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 semanas o más.

Métodos de tratamientos y propiedades de reducción del crecimiento tumoral

[00221] También se proporciona, en ciertas realizaciones, métodos para tratar una afección asociada con células malignas que expresan TROP2 en un sujeto que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de dominios de unión a TROP2 o proteínas multiespecíficas (incluidas proteínas multiespecíficas condicionalmente activas) que comprenden un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación, o un CAR o un ProCAR que comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende la misma. En algunas realizaciones, la afección es un cáncer.

[00222] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento o progresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan TROP2, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de dominios de unión a TROP2 o proteínas multiespecíficas que comprenden un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación, o un CAR que comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, o una composición farmacéutica que comprende la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis de células malignas que expresan TROP2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de dominios de unión a TROP2 o proteínas multiespecíficas que comprenden un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación, o una composición farmacéutica que comprende la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para inducir la regresión tumoral en un sujeto que tiene células malignas que expresan TROP2, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de

dominios de unión a TROP2 o proteínas multiespecíficas que comprenden un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación, o una composición farmacéutica que comprende la misma. En algunas realizaciones, los métodos como se describen en el presente documento comprenden además administrar una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es un agente bioterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo. En algunas realizaciones, el segundo agente terapéutico es una citocina, TNF α (Factor de Necrosis Tumoral alfa), un inhibidor de PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico), un virus oncolítico, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de IDO (indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa), un inhibidor de glutaminasa GLS1, una terapia de linfocitos T-CAR (receptor de antígeno quimérico) o de linfocitos T, un agonista de TLR (receptor tipo Toll) (*por ejemplo*, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9) o una vacuna tumoral.

[00223] En determinadas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación reducen el crecimiento de las células tumorales *in vivo* cuando se administra a un sujeto que tiene células tumorales que expresan TROP2. La medición de la reducción del crecimiento de células tumorales puede determinarse mediante múltiples metodologías diferentes bien conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen la medición directa de la dimensión del tumor, medición de la masa tumoral extirpada y comparación con sujetos de control, medición mediante técnicas de formación de imágenes (*por ejemplo*, TAC o RMN) que pueden o no usar isótopos o moléculas luminiscentes (*por ejemplo*, luciferasa) para un análisis mejorado y similares. En realizaciones específicas, la administración de las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación da como resultado una reducción del crecimiento *in vivo* de las células tumorales en comparación con un agente de unión a antígeno de control en al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, con una reducción de aproximadamente el 100 % en el crecimiento tumoral que indica una respuesta completa y la desaparición del tumor. En realizaciones adicionales, la administración de las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación da como resultado una reducción del crecimiento *in vivo* de las células tumorales en comparación con un agente de unión a antígeno de control en aproximadamente del 50-100 %, aproximadamente del 75-100 % o aproximadamente del 90-100 %. En realizaciones adicionales, la administración de las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación da como resultado una reducción del crecimiento *in vivo* de las células tumorales en comparación con un agente de unión a antígeno de control en aproximadamente del 50-60 %, aproximadamente del 60-70 %, aproximadamente del 70-80 %, aproximadamente del 80-90 %, o aproximadamente del 90-100 %. En algunas realizaciones, la administración de las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación da como resultado una reducción completa del crecimiento de células tumorales, por ejemplo, el crecimiento de células

tumorales *in vivo* en 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días de la primera administración. En algunas realizaciones, la reducción del crecimiento de las células tumorales, por ejemplo, el crecimiento de células tumorales *in vivo* dura más de 1 hora, 2 horas, 5 horas, 10 horas, 23 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 20 días, 30 días, 35 días, 40 días, 45 días, 50 días o más.

[00224] En algunas realizaciones, un fármaco activo y un profármaco que contiene proteínas de unión a TROP2 idénticas de la divulgación reducen el crecimiento de células tumorales de manera comparable *in vivo* cuando se administra a un sujeto que tiene células tumorales que expresan TROP2 en una cantidad equivalente molar.

[00225] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se administran para tratar una afección neoplásica. Las afecciones neoplásicas, en algunas realizaciones, son benignas o malignas; tumores sólidos u otra neoplasia sanguínea; y, en algunas realizaciones, se seleccionan del grupo que incluye, pero sin limitación: tumores de la glándula suprarrenal, cánceres asociados con el SIDA, sarcoma alveolar de partes blandas, tumores astrocíticos, tumores de ganglios autónomos, cáncer de vejiga (carcinoma de células escamosas y carcinoma de células de transición), trastornos blastocéllicos, cáncer de hueso (adamantinoma, quistes óseos aneurismáticos, osteocondroma, osteosarcoma), cánceres de cerebro y de médula espinal, tumores cerebrales metastásicos, cáncer de mama, incluido el cáncer de mama triple negativo, tumores del cuerpo carotídeo, cáncer de cuello de útero, condrosarcoma, cordoma, carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células claras, cáncer de colon, cáncer colorrectal, histiocitomas fibrosos benignos cutáneos, tumores desmoplásicos de células redondas pequeñas, ependimomas, trastornos epiteliales, tumores de Ewing, condrosarcoma mixoide extraesquelético, fibrogénesis imperfecta osio, displasia fibrosa del hueso, cánceres de vesícula biliar y conducto biliar, cáncer gástrico, gastrointestinal, enfermedad trofoblástica gestacional, tumores de células germinales, trastornos glandulares, cánceres de cabeza y cuello, hipotalámico, cáncer de intestino, tumores de células de los islotes, Sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (nefroblastoma, carcinoma de células renales papilares), leucemias, lipoma/tumores lipomatosos benignos, liposarcoma/tumores lipomatosos malignos, cáncer de hígado (hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular), linfomas, cánceres de pulmón (carcinoma microcítico, adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de células grandes, etc.), trastornos macrofágicos, meduloblastoma, melanoma, meningiomas, neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, cánceres de páncreas, carcinomas papilares de tiroides, tumores paratiroides, cánceres pediátricos, tumores de la vaina del nervio periférico, feocromocitoma, tumores de hipófisis, cáncer de próstata, melanoma

uveal posterior, trastornos hematológicos raros, cáncer metastásico renal, tumor rabdoide, rabdomiosarcoma, sarcomas, cáncer de piel, sarcomas de tejidos blandos, cáncer de células escamosas, cáncer de estómago, trastornos estromales, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, carcinoma tímico, timoma, cáncer metastásico de tiroides y cánceres uterinos (carcinoma de cuello uterino, carcinoma de endometrio y leiomioma).

[00226] En ciertas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se usan como una terapia de primera línea y se administran a sujetos que no han sido tratados previamente por la afección cancerosa. En otras realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se usan para tratar sujetos que se han tratado previamente (con una proteína de unión a TROP2 de esta divulgación o con otro antineoplásico) y han recaído o se ha determinado que son refractarios al tratamiento anterior. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se usan para tratar sujetos que tienen tumores recurrentes.

[00227] En algunas realizaciones, una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, incluyendo una proteína multiespecífica, un CAR o un ProCAR como se describe en el presente documento, se administra para tratar un cáncer con expresión y prevalencia generalizadas de TROP2, incluyendo, pero sin limitación, cáncer colorrectal, de próstata, neuroendocrino, de tiroides, de pulmón (tanto cánceres de pulmón no microcítico como microcítico), gástrico, de ovario, de endometrio, pancreático, de vías biliares y vesícula biliar, esofágico, de mama, un adenocarcinoma o cualquier combinación de los mismos.

[00228] En algunos aspectos, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se administran para tratar un trastorno proliferativo que comprende un tumor sólido que incluye, pero sin limitación, suprarrenal, hígado, riñón, vejiga, de mama, gástrico, de ovario, de cuello uterino, de útero, esofágico, colorrectal, próstata, pancreático, de pulmón (tanto microcítico como no microcítico), tiroides, carcinomas, sarcomas, glioblastomas, diversos tumores de cabeza y cuello, o cualquier combinación de los mismos.

[00229] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se administran a un sujeto que padece melanoma. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la presente divulgación se usan para diagnosticar, controlar, tratar o prevenir el melanoma. El término "melanoma", como se usa en el presente documento, incluye todos los tipos de melanoma incluyendo, pero sin limitación, melanoma primario, melanoma maligno, melanoma cutáneo, melanoma extracutáneo, melanoma de diseminación superficial, melanoma polipoide, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma *in situ*, melanoma maligno nodular, melanoma sobre lentigo maligno, melanoma lentiginoso, melanoma maligno lentiginoso,

melanoma lentiginoso mucoso, melanoma mucoso, melanoma lentiginoso acral, melanoma de tejidos blandos, melanoma ocular, melanoma invasivo, síndrome de lunar y melanoma atípicos familiares (FAM-M), melanoma maligno desmoplásico, melanoma uveal, o cualquier combinación de los mismos.

[00230] En algunas realizaciones, las posibles indicaciones para la administración de las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación o las composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas son enfermedades tumorales, especialmente cánceres/carcinomas epiteliales tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres del tracto genitourinario, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cánceres del conducto biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides. En algunas realizaciones, la administración de las proteínas de unión a TROP2 de esta divulgación o composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas está indicada para la enfermedad residual mínima, tal como un tumor sólido temprano, tumor sólido avanzado o tumor sólido metastásico, que se caracteriza por la reaparición local y no local del tumor provocada por la supervivencia de células individuales, o cualquier combinación de los mismos.

[00231] En aspectos seleccionados, una proteína de unión a TROP2 de la divulgación se incorpora en unos receptores de antígenos quiméricos (CAR) y el TROP2 CAR se administra en una terapia basada en CAR eficaz para tratar un cáncer, tales como: cánceres/carcinomas epiteliales tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cánceres del tracto genitourinario, por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino y cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cánceres del conducto biliar, cáncer de esófago, cáncer de las glándulas salivales y cáncer de la glándula tiroides, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico (*por ejemplo*, cáncer de pulmón no microcítico de células escamosas o cáncer de pulmón microcítico de células escamosas), carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC), o cualquier combinación de los mismos.

[00232] Un receptor de antígeno quimérico es generalmente una proteína o polipéptido híbrido construido artificialmente que contiene o comprende un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo unido a un dominio de señalización (*por ejemplo*, señalización de linfocitos T o dominios de activación de linfocitos T). En algunas realizaciones, los CAR que comprenden la proteína de unión a TROP2 de la presente divulgación tienen la capacidad de redirigir la especificidad y la reactividad de los linfocitos sensibilizados (*por ejemplo*, linfocitos T) hacia

células diana positivas para TROP2 de una manera no restringida por MHC aprovechando las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El reconocimiento de antígeno no restringido por MHC proporciona a los linfocitos T que expresan CAR de TROP2 la capacidad de reconocer TROP2 tumorigénico independientemente del procesamiento de antígeno, evitando de este modo un mecanismo importante de evasión tumoral. Además, cuando se expresan en linfocitos T, los CAR ventajosamente no se dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor de linfocitos T (TCR) endógeno.

[00233] En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 divulgadas se administran a pacientes refractarios (*es decir*, aquellos cuya enfermedad recurre durante o poco después de completar un curso de terapia inicial); pacientes sensibles (*es decir*, aquellos cuya recaída dura más de 2-3 meses después de la terapia primaria); o pacientes que muestran resistencia a un agente basado en platino (*por ejemplo*, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino) y/o un taxano (*por ejemplo*, docetaxel, paclitaxel, larotaxel o cabazitaxel). En otra realización, los tratamientos con CAR de TROP2 divulgados son eficaces para tratar el cáncer de ovario, incluyendo el carcinoma seroso de ovario y el carcinoma seroso papilar de ovario.

[00234] En otra realización, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos se usan en la terapia de mantenimiento para reducir o eliminar la posibilidad de recurrencia del tumor después de la presentación inicial de la enfermedad. En algunos casos, se ha tratado el trastorno y se ha eliminado la masa tumoral inicial, se ha reducido o mejorado de otra manera para que el paciente esté asintomático o en remisión. En ese momento, al sujeto se le administran cantidades farmacéuticamente eficaces de las proteínas de unión a TROP2 divulgadas de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos una o más veces independientemente de si hay poca o ninguna indicación de enfermedad usando procedimientos de diagnóstico estándar. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos se administra en un programa regular durante un período de tiempo, como semanal, cada dos semanas, mensualmente, cada seis semanas, cada dos meses, cada tres meses, cada seis meses o anualmente, por ejemplo, para reducir el potencial de recurrencia de la enfermedad. Además, tales tratamientos se continúan en algunas realizaciones durante un período de semanas, meses, años o incluso indefinidamente dependiendo de la respuesta del paciente y los parámetros clínicos y de diagnóstico.

[00235] En otra realización más, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos se usan

de manera profiláctica o como terapia adyuvante para prevenir o reducir la posibilidad de metástasis tumoral después de un procedimiento de reducción de volumen. Como se usa en la presente divulgación, un "procedimiento de reducción de volumen", significa cualquier procedimiento, técnica o método que elimina, reduce, trata o mejora un tumor o proliferación tumoral. Los procedimientos de reducción de volumen ilustrativos incluyen, pero sin limitación, una cirugía, tratamientos de radiación (*es decir*, radiación de haz), quimioterapia, inmunoterapia o ablación. En algunas realizaciones, en los momentos apropiados, las proteínas de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos se administran según lo sugerido por procedimientos clínicos, de diagnóstico o teranósticos para reducir la metástasis tumoral. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación va acompañado de técnicas de diagnóstico o monitorización apropiadas que permiten modificarlo.

[00236] Otras realizaciones más de la divulgación comprenden administrar la proteína de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos a sujetos que son asintomáticos pero en riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo. Es decir, en algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 de la divulgación, el CAR de TROP2, o los linfocitos sensibilizados con TROP2, o cualquier combinación de los mismos se usan en sentido preventivo y se administran a pacientes que han sido examinados o probados y tienen uno o más factores de riesgo señalados (*por ejemplo*, indicaciones genómicas, antecedentes familiares, resultados de pruebas *in vivo* o *in vitro*, etc.) pero no han desarrollado neoplasia. En tales casos, los expertos en la materia podrían determinar un régimen de dosificación eficaz a través de la observación empírica o a través de prácticas clínicas aceptadas.

[00237] En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las proteínas de unión a TROP2 o las composiciones descritas en el presente documento se administran en combinación con un agente para el tratamiento de la enfermedad particular, trastorno o dolencia, también denominado en el presente documento como un agente terapéutico adicional. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, terapias que implican anticuerpos, moléculas pequeñas (*por ejemplo*, agentes antineoplásicos), hormonas (esteroidea, péptido y similares), radioterapias (rayos γ , rayos X y/o el suministro dirigido de radioisótopos, microondas, radiación UV y similares), terapias génicas (*por ejemplo*, antisentido, terapia retroviral y similares) y otras inmunoterapias. En algunas realizaciones, una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento se administra en combinación con agentes antidiarreicos, agentes antieméticos, analgésicos, opioides y/o agentes antiinflamatorios no esteroideos. En algunas realizaciones, una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento se administra en

combinación con agentes antineoplásicos. Ejemplos no limitativos de agentes antineoplásicos que se pueden usar en las diversas realizaciones de la divulgación, incluyendo composiciones farmacéuticas y formas de dosificación y kits de la divulgación, incluyen: acivicina; aclarrubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; amsacrina; anastrozol; antramycin; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; broprimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carrubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diacicuona; docetaxel; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; fosfato sódico de estramustina; etanidazol; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofofina; interleucina II (incluyendo la interleucina II recombinante o rIL2), interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1 interferón alfa-n3; interferón beta-1a; interferón gamma-1b; iproplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreótido; letrozol; acetato de leuprolídeo; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocol; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedopa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisuran; paclitaxel; pegaspargasa; peliomycin; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobromano; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiomicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puromycin; clorhidrato de puromycin; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfin; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato;

triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vinblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinzolidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina. Otros ejemplos de fármacos antineoplásicos incluyen, pero sin limitación: 20-epi-1,25-dihidroxitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética anti-dorsalizante 1; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores de genes de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosporina; derivados de lactama β ; β -aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inhibidores de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; sulfoximina de butionina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; IL-2 de viruela aviar; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboximidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; deslorelina; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diacicuona; didemnina B; didox; dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil-espiromustina; docetaxel; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebseleno; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorrubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; texapirina de gadolinio; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; herregulina; hexametilen-bisacetamida; hipericina; ácido ibandrónico;

idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina; agonistas del interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamelarina N; lanreótido; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinano; leptolstatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón α leucocítico; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido de disacárido lipófilo; compuestos de platino lipófilos; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; inhibidor de la HMG-CoA reductasa (tal como, pero sin limitación, lovastatina, Pravastatina, Fluvastatina, Estatina, Simvastatina y Atorvastatina); loxoribina; lurtotecán; texafirina de luteccio; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasa de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario defectuoso; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; mitotoxina de factor de crecimiento de fibroblastos-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotrofina coriónica humana; monofosforil lípido A + sk de pared celular de miobacteria; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; terapia basada en el supresor 1 de tumores múltiples; agente antineoplásico de mostaza; micaperóxido B; extracto de la pared celular de micobacteria; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorrubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores del óxido nítrico; antioxidante de nitrógeno; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocina oral; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; paclitaxel; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilílico; fenazinomicina; acetato de fenilo; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo de platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; propil-bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; inmunomodulador basado en proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgal; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de

polioxi-etileno-hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidores de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re 186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de la transducción de señales; proteína de unión al antígeno de cadena sencilla; sizofirano; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína de unión a la somatostatina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiostatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamicina; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramin; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metyoduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinán; hormona estimulante tiroidea; etiopurpurina de etilo y de estaño; tirapazamina; bicloruro de titanoceno; topsentina; toremifeno; factor de células madre pluripotenciales; inhibidores de la transducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor de crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vector, terapia génica eritrocítica; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinixaltina; Vitaxin®; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y estimalámero de zinostatina. Fármacos anticancerígenos adicionales son 5-fluorouracilo y leucovorina. Estos dos agentes son particularmente útiles cuando se usan en métodos que emplean talidomida y un inhibidor de topoisomerasa. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 de la presente divulgación se usa en combinación con gemcitabina. En algunas realizaciones, la proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento se administra antes, durante o después de la cirugía.

Métodos de detección de expresión de TROP2 y diagnóstico de cáncer asociado con TROP2

[00238] De acuerdo con otra realización de la divulgación, se proporcionan kits para detectar la expresión de TROP2 *in vitro* o *in vivo*. Los kits incluyen la proteína de unión a TROP2 anterior (*por ejemplo*, una proteína de unión a TROP2 que contiene un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 marcado o fragmentos de unión a antígeno del mismo), y uno o más compuestos para detectar el marcador. En algunas realizaciones, el marcador se selecciona del grupo que consiste en

un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador radioactivo, un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente y un marcador cromóforo.

[00239] En algunos casos, la expresión de TROP2 se detecta en una muestra biológica. La muestra puede ser cualquier muestra, incluyendo, pero sin limitación, tejido de biopsias, autopsias y muestras de anatomía patológica. Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, por ejemplo, secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Las muestras biológicas incluyen además fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, esputo, líquido cefalorraquídeo u orina. Una muestra biológica se obtiene normalmente de un mamífero, tal como un primate humano o no humano.

[00240] En una realización, se proporciona un método para determinar si un sujeto tiene cáncer poniendo en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 como se divulga en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo de dominio único a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control identifica que el sujeto tiene cáncer.

[00241] En otra realización, se proporciona un método para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto poniendo en contacto una muestra de un sujeto diagnosticado con cáncer con un anticuerpo de dominio único anti-TROP2 como se divulga en el presente documento; y detectar la unión del anticuerpo a la muestra. Un aumento en la unión del anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del anticuerpo a una muestra de control confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.

[00242] En algunos ejemplos de los procedimientos divulgados, el anticuerpo de dominio único de TROP2 se marca directamente. En algunos ejemplos, los métodos incluyen además poner en contacto un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo de dominio único anti-TROP2 con la muestra; y detectar la unión del segundo anticuerpo. Un aumento en la unión del segundo anticuerpo a la muestra en comparación con la unión del segundo anticuerpo a una muestra de control detecta cáncer en el sujeto o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto. En algunos casos, el cáncer es un cáncer neuroendocrino, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, carcinoma epidermoide, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, cáncer de mama triple negativo o cáncer de ovario (tal como carcinoma epitelial de ovario), o cualquier otro tipo de cáncer que exprese TROP2. En algunos ejemplos, la muestra de control es una muestra de un sujeto sin cáncer. En ejemplos particulares, la muestra es una muestra de sangre o tejido.

[00243] En algunos casos, el anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a TROP2 se marca directamente con un marcador detectable. En otra realización, el anticuerpo que se une (por ejemplo, se une específicamente) a TROP2 (el primer anticuerpo) no está marcado y un

segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo que se une específicamente a TROP2 está marcado. Se selecciona un segundo anticuerpo de manera que tenga la capacidad de unirse específicamente a la especie y clase específica del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG de llama, entonces el anticuerpo secundario puede ser un anti-IgG de llama. Otras moléculas que se pueden unir a los anticuerpos incluyen, sin limitación, proteína A y proteína G, ambas de las cuales están disponibles comercialmente. Los marcadores adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se describen anteriormente e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radiactivos. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos no limitantes de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos no limitativos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un material luminiscente de ejemplo no limitante es el luminol; un ejemplo no limitativo de un agente magnético es gadolinio, y los marcadores radiactivos ilustrativos no limitativos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[00244] En una realización alternativa, TROP2 puede analizarse en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de TROP2 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo no marcado que se une específicamente a TROP2. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de TROP2 marcados y el anticuerpo que se une específicamente a TROP2 se combinan y se determina la cantidad de patrón de TROP2 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de TROP2 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de TROP2 marcado unido al anticuerpo que se une específicamente a TROP2.

[00245] Los inmunoensayos y el método divulgados en el presente documento se pueden usar para una serie de propósitos. En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a TROP2 puede usarse para detectar la producción de TROP2 en células en cultivo celular. En otra realización, el anticuerpo puede usarse para detectar la cantidad de TROP2 en una muestra biológica, tal como una muestra de tejido o una muestra de sangre o suero. En algunos ejemplos, el TROP2 es TROP2 de superficie celular. En otros ejemplos, el TROP2 es TROP2 soluble (*por ejemplo*, TROP2 en un sobrenadante de cultivo celular o TROP2 soluble en una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de sangre o suero).

[00246] En una realización, se proporciona un kit para detectar TROP2 en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o muestra de tejido. Por ejemplo, para confirmar un diagnóstico de

cáncer en un sujeto, se puede realizar una biopsia para obtener una muestra de tejido para su examen histológico. Como alternativa, se puede obtener una muestra de sangre para detectar la presencia de proteína o fragmento de TROP2 soluble. Los kits para detectar un polipéptido comprenderán típicamente un anticuerpo de dominio único, de acuerdo con la presente divulgación, que se une específicamente a TROP2. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento scFv, un dominio VH o un Fab está incluido en el kit. En una realización adicional, el anticuerpo está marcado (por ejemplo, con un marcador fluorescente, radiactivo o un marcador enzimático).

[00247] En una realización, un kit incluye materiales de instrucción que divulgan medios de uso de un anticuerpo que se une a TROP2. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en forma electrónica (tal como un disquete de ordenador o disco compacto), puede ser visual (como archivos de vídeo) o proporcionarse a través de una red electrónica, por ejemplo, en Internet, la World Wide Web, una intranet u otra red. Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que se diseña el kit. Por lo tanto, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios de detección de un marcador (tal como sustratos enzimáticos para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados tales como un anticuerpo secundario o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos utilizados habitualmente para la puesta en práctica de un procedimiento particular. Dichos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia.

[00248] En una realización, el kit de diagnóstico comprende un inmunoensayo. Aunque los detalles de los inmunoensayos pueden variar con el formato particular empleado, el método para detectar TROP2 en una muestra biológica generalmente incluye las etapas de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reacciona específicamente, en condiciones inmunológicamente reactivas, a un polipéptido TROP2. Se permite que el anticuerpo se una específicamente en condiciones inmunológicamente reactivas para formar un complejo inmunitario, y la presencia del complejo inmunitario (anticuerpo unido) se detecta directa o indirectamente.

[00249] Los métodos para determinar la presencia o ausencia de un marcador de superficie celular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con otros compuestos que incluyen, pero sin limitación, enzimas, perlas magnéticas, perlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radiactivos o fármacos. Los anticuerpos también se pueden utilizar en inmunoensayos tales como, pero sin limitación, radioinmunoensayos (RIA), ELISA o ensayos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos también se pueden usar para la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). FACS emplea una

pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtusa, y canales de impedancia, entre otros niveles más sofisticados de detección, para separar u ordenar las células. Véase la patente de Estados Unidos n.º 5.061.620). Cualquiera de los anticuerpos de dominio único que se unen a TROP2, como se divulga en el presente documento, pueden usarse en estos ensayos. Por lo tanto, los anticuerpos pueden usarse en un inmunoensayo convencional, incluyendo, sin limitación, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica tisular, transferencia Western o inmunoprecipitación.

Determinadas definiciones

[00250] La terminología utilizada en el presente documento es con el fin de describir casos particulares únicamente y no pretende ser limitante. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/una" y "el/la" también pretenden incluir las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, tales términos pretenden ser inclusivos de una manera similar al término "que comprende".

[00251] El término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, por ejemplo, de las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar más/menos 1 o más de 1 desviación típica, según la práctica en el valor dado. Cuando se describan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe suponer que el término "aproximadamente" significa un intervalo de error aceptable para el valor particular.

[00252] Los términos "individuo", "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente. Ninguno de los términos requiere o se limita a una situación caracterizada por la supervisión (*por ejemplo*, constanteo intermitente) de un trabajador de la salud (*por ejemplo*., un doctor, una enfermera registrada, una enfermera practicante, un asistente médico, un celador o un trabajador de cuidados paliativos).

[00253] Un "anticuerpo" se refiere típicamente a una proteína tetramérica en forma de Y que comprende dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos ligeras (L) unidas por enlaces disulfuro covalentes e interacciones no covalentes. Las cadenas ligeras humanas comprenden un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL) en donde el dominio constante puede clasificarse fácilmente como kappa o lambda basándose en la secuencia de aminoácidos y los loci de genes. Cada cadena pesada comprende un dominio variable (VH) y una región constante, que en el caso de IgG, IgA e IgD, comprende tres dominios denominados CH1, CH2 y CH3 (IgM e IgE tienen un

cuarto dominio, CH4). En clases de IgG, IgA e IgD, los dominios CH1 y CH2 están separados por una región bisagra flexible, que es un segmento rico en prolina y cisteína de longitud variable (generalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 aminoácidos en IgG). Los dominios variables tanto en la cadena ligera como en la pesada se unen a los dominios constantes mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos y la cadena pesada también tiene una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos adicionales. Cada clase de anticuerpo comprende además enlaces disulfuro inter-cadena e intra-cadena formados por restos de cisteína emparejados. Hay dos tipos de puentes o enlaces disulfuro nativos en las moléculas de inmunoglobulina: enlaces disulfuro intercatenarios e intracatenarios. La ubicación y el número de enlaces disulfuro intercatenarios varían de acuerdo con la clase y especie de inmunoglobulina. Los enlaces disulfuro intercatenarios se localizan en la superficie de la inmunoglobulina, son accesibles al disolvente y, por lo general, se reducen con relativa facilidad. En el isotipo de IgG1 humana hay cuatro enlaces disulfuro intercatenarios, uno de cada cadena pesada a la cadena ligera y dos entre las cadenas pesadas. Los enlaces disulfuro intercatenarios no son necesarios para la asociación de cadenas. Como es bien sabido, la región bisagra de IgG1 rica en cisteína de la cadena pesada se ha sostenido generalmente que consiste en tres partes: una bisagra superior, una bisagra central y una bisagra inferior. Los expertos en la materia apreciarán que la región bisagra de IgG1 contiene las cisteínas en la cadena pesada que comprenden los enlaces disulfuro intercatenarios (dos pesada/pesada, dos pesada/ligera), que proporcionan una flexibilidad estructural que facilita los movimientos de Fab. El enlace disulfuro intercatenario entre la cadena ligera y pesada de IgG1 se forma entre C214 de la cadena ligera kappa o lambda y C220 en la región bisagra superior de la cadena pesada. Los enlaces disulfuro intercatenarios entre las cadenas pesadas están en las posiciones C226 y C229 (todas numeradas según el índice EU de acuerdo con Kabat, *et al.*, *infra.*)

[00254] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos multiclones, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos desinmunizados, humanizados y primatizados, anticuerpos injertados con CDR, anticuerpos humanos, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monovalentes (*por ejemplo*, una IgG monovalente), anticuerpos multivalentes, anticuerpos antidiotipo, anticuerpos sintéticos, incluyendo muteínas y variantes de las mismas, fragmentos de anticuerpos inmunoespecíficos tales como: hIgG, una V-NAR, Fv, Fd, Fab, F(ab')₂, F(ab'), Fab2, fragmentos Fab3, fragmentos de cadena única (*por ejemplo*, di-scFv, scFv, scFvFc, cremallera scFv, scFab), Fv unidos por enlaces disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único tales como nanocuerpos o anticuerpos de dominio variable único que

comprenden simplemente un dominio variable tal como sdAb (dominios VH, VL o VHH), "r IgG" ("medio anticuerpo"), diacuerpos, diacuerpos de cadena sencilla, diacuerpos en tándem (Tandab), di-scFv en tándem, tri-scFv en tándem, los "minicuerpos" se ejemplifican en algunos casos por una estructura que es como sigue: (VH-VL-CH3)₂, (scFv-CH3)₂, ((scFv)₂-CH3+CH3), ((scFv)₂-CH3) o (scFv-CH3-scFv)₂, multicuerpos tales como triacuerpos o tetracuerpos; y derivados de los mismos que incluyen fusiones Fc y otras modificaciones, y cualquier otra molécula inmunorreactiva siempre que comprenda un dominio que tenga un sitio de unión para asociación preferencial o unión con una proteína TROP2. Además, a menos que se indique lo contrario por restricciones contextuales, el término comprende además todas las clases de anticuerpos (*es decir*, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y todas las subclases (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2). Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se indican típicamente con la correspondiente letra griega alfa en minúscula, delta, ε, gamma y mu, respectivamente. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 comprenden un anticuerpo solo de cadena pesada, tal como un dominio VH o VHH. En algunos casos, las proteínas de unión a TROP2 comprenden un anticuerpo solo de cadena pesada que es un dominio VH humano diseñado. En algunos ejemplos, el dominio VH humano modificado se produce mediante selección de bibliotecas de expresión de fagos. En algunas realizaciones, las proteínas de unión a TROP2 comprenden un VHH. El término "VHH", como se usa en el presente documento, se refiere a un dominio de unión de anticuerpo de cadena sencilla desprovisto de cadena ligera. En algunos casos, un VHH se deriva de un anticuerpo del tipo que se puede encontrar en Camelidae o peces cartilaginosos que carecen naturalmente de cadenas ligeras o a un VHH sintético y no inmunizado que se puede construir en consecuencia. Cada cadena pesada comprende una región variable codificada por exones V, D y J. Un VHH, en algunos casos, es un VHH natural, tal como un VHH derivado de camélido, o una proteína recombinante que comprende un dominio variable de cadena pesada. En algunas realizaciones, el VHH se deriva de una especie seleccionada del grupo que consiste en camellos, llamas, vicuñas, guanacos y peces cartilaginosos (tales como, pero sin limitarse a, tiburones). En otra realización, el VHH se deriva de una alpaca (tal como, pero sin limitación, una alpaca Huacaya o una alpaca Suri).

[00255] Como se usa en el presente documento, "región variable" o "dominio variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en todos los

dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan la región marco conservada (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca de las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos. La asignación de aminoácidos a cada dominio, la región marco y la CDR es, en algunas realizaciones, de acuerdo con uno de los esquemas de numeración proporcionados por Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5ª Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, Publicación de NIH n.º 91-3242; Chothia *et al.*, 1987, PMID: 3681981; Chothia *et al.*, 1989, PMID: 2687698; MacCallum *et al.*, 1996, PMID: 8876650; o Dubel, Ed. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*, 3.ª Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH y Co o AbM (Oxford Molecular/MSI Pharmacopeia) a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones de esta divulgación, las proteínas de unión a TROP2 comprenden anticuerpos solo de cadena pesada, tales como dominios VH o VHH, y comprenden tres CDR. Dichos anticuerpos solo de cadena pesada, en algunas realizaciones, se unen a TROP2 como un monómero sin dependencia de la dimerización con una región VL (variable de cadena ligera) para una afinidad de unión óptima.

[00256] "Numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, *etc.* de acuerdo con Kabat) después del resto de FR de cadena

pesada 82. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón". No se pretende que las CDR de la presente divulgación correspondan necesariamente a la convención de numeración de Kabat.

[00257] El término restos (o regiones) de "marco" o "FR" se refieren a restos de dominio variable distintos de los restos de región de CDR o hipervariable como se define en el presente documento. Un "marco de consenso humano" es un marco que representa el resto de aminoácido que se produce más comúnmente en una selección de secuencias de marco de VL o VH de inmunoglobulina humana.

[00258] El término "epítopo", como se usa en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como parátipo. Un único antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítipo conformacional se produce mediante aminoácidos yuxtapuestos de manera espacial de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítipo lineal es uno producido por restos de aminoácidos adyacentes en una cadena polipeptídica. En una determinada circunstancia, un epítipo puede incluir fracciones de sacáridos, grupos fosforilo o grupos sulfonilo en el antígeno.

[00259] Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tomar en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la técnica, por ejemplo, usando programas de software informático disponibles públicamente tales como software EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS LALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

[00260] Como se usa en el presente documento, "semitiempo de eliminación" se utiliza en su sentido ordinario, como se describe en The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, de Goodman y

Gilman, 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman y Alfred Gilman, eds., 6ª ed. 1980). Brevemente, la expresión quiere decir que abarca una medida cuantitativa del transcurso de tiempo de la eliminación del fármaco. La eliminación de la mayoría de los fármacos es exponencial (*es decir*, sigue una cinética de primer orden), dado que las concentraciones de fármaco no se aproximan a las requeridas para la saturación del proceso de eliminación. La tasa de un proceso exponencial puede expresarse por su constante de velocidad, k , que expresa el cambio fraccional por unidad de tiempo o por su semitiempo, $t_{1/2}$ el tiempo requerido para completar un 50 % del proceso. Las unidades de estas dos constantes son tiempo⁻¹ y tiempo, respectivamente. Una constante de velocidad de primer orden y el semitiempo de la reacción se relacionan de forma simple ($k \times t_{1/2} = 0,693$) y por consiguiente, pueden intercambiarse. Dado que la cinética de eliminación de primer orden establece que se pierde una fracción constante de fármaco por unidad de tiempo, un gráfico del log de la concentración de fármaco frente al tiempo es lineal siempre, tras la fase de distribución inicial (*es decir*, después de que se completa la absorción y distribución del fármaco). El semitiempo para la eliminación del fármaco puede determinarse con exactitud a partir de tal gráfico.

[00261] Como se usa en el presente documento, el término "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de las proteínas descritas en la divulgación a sus dianas de unión y se expresa numéricamente usando valores " K_D ". Si se indica que dos o más proteínas tienen afinidades de unión comparables hacia sus dianas de unión, entonces los valores K_D para la unión de las proteínas respectivas hacia sus dianas de unión, están dentro de ± 2 veces entre sí. Si se indica que dos o más proteínas tienen afinidades de unión comparables hacia una sola diana de unión, entonces los valores K_D para la unión de las proteínas respectivas hacia dicha única diana de unión, están dentro de ± 2 veces entre sí. Si se indica que una proteína se une a dos o más dianas con afinidades de unión comparables, entonces los valores K_D para la unión de dicha proteína a las dos o más dianas están dentro de ± 2 veces entre sí. En general, un valor K_D más alto corresponde a una unión más débil. En algunas realizaciones, la " K_D " se mide mediante un ensayo de unión de antígenos radiomarcados (RIA) o ensayos de resonancia de plasmones de superficie usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). En determinadas realizaciones, una "tasa de activación" o "tasa de asociación" o "tasa de asociación" o "kon" y una "tasa de desactivación" o "tasa de disociación" o "tasa de disociación" o "koff" también se determinan con la técnica de resonancia de plasmones de superficie usando un BIACORE™-2000 o un BIACORE™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). En realizaciones adicionales, la " K_D ", "kon" y "koff" se miden usando los sistemas OCTET® (Pall Life Sciences). En un método ilustrativo para medir la afinidad de unión usando los sistemas OCTET®, el ligando, por ejemplo, TROP2 humana

o de macaco cangrejero biotinilada, se inmoviliza en la superficie de la punta del sensor capilar de estreptavidina OCTET®, cuyas puntas de estreptavidina se activan a continuación de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando aproximadamente 20-50 µg/ml de proteína TROP2 humana o de macaco cangrejero. También se introduce una solución de PBS/Caseína como agente de bloqueo. Para mediciones cinéticas de asociación, las variantes de proteína de unión a TROP2 se introducen a una concentración que varía de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 5 µg/ml, o de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 20 µg/ml. En algunas realizaciones, las proteínas de dominio único de unión a TROP2 se usan a una concentración que varía de aproximadamente 2 ng/ml a aproximadamente 20 µg/ml. Se observa una disociación completa en el caso del control negativo, tampón de ensayo sin las proteínas de unión. Los parámetros cinéticos de las reacciones de unión se determinan luego usando una herramienta apropiada, por ejemplo, software ForteBio.

[00262] Como se usa en el presente documento, en algunas realizaciones, "tratamiento" o "tratar" o "tratado" se refiere a un tratamiento terapéutico en donde el objetivo es ralentizar (disminuir) una condición fisiológica no deseada, trastorno o enfermedad, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines descritos en el presente documento, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de los síntomas; la disminución del alcance de la afección, trastorno o enfermedad; la estabilización (*es decir*, no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad; el retraso en la aparición o la ralentización de la progresión de la afección, trastorno o enfermedad; la mejoría de la afección, trastorno o patología; y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable, o la potenciación o mejoría de la afección, trastorno o enfermedad. El tratamiento incluye desencadenar una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En otras realizaciones, "tratamiento" o "tratar" o "tratado" se refiere a medidas profilácticas, en donde el objeto es retrasar la aparición o reducir la gravedad de una condición fisiológica no deseada, trastorno o enfermedad particular, tal como, por ejemplo, es una persona que está predispuesta a una enfermedad (*por ejemplo*, un individuo que porta un marcador genético para una enfermedad tal como el cáncer de mama).

[00263] Un "TriTAC", un "TRITAC dirigido a TROP2", o una "proteína triespecífica dirigida a TROP2", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de unión triespecífica que no se activa condicionalmente, y comprende un resto de unión que es específico para una proteína de suero en masa, un primer dominio de unión a antígeno diana y un segundo dominio de unión a antígeno diana, en donde al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana y el segundo dominio de unión a antígeno

diana comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento, y al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana y el segundo dominio de unión a antígeno diana comprende un dominio que se une un CD3, tal como un CD3 humano.

[00264] Un "ProTriTAC", o una "proteína protriespecífica dirigida a TROP2", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de unión triespecífica que se activa condicionalmente y comprende (i) un enlazador escindible (*por ejemplo*, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 497-543)), (ii) un resto de unión que es específico para una proteína de suero en masa y también comprende un resto de enmascaramiento (*por ejemplo*, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 549) que prohíbe la unión de un primer dominio de unión a antígeno diana o un segundo dominio de unión a antígeno diana a su diana, en donde al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana y el segundo dominio de unión a antígeno diana comprende una proteína de unión a TROP2 como se describe en el presente documento. Las proteínas ProTriTAC de esta divulgación, en algunos casos, se activan desde un estado enmascarado a un estado activo mediante la escisión del enlazador escindible, por ejemplo, en un entorno rico en proteasas, tal como en un microentorno tumoral, para formar un fármaco activo. Un fármaco activo, como se proporcionan en el presente documento, en algunos casos, comprende un dominio de unión a TROP2 de la divulgación y un dominio de unión a CD3 de la divulgación. Se proporciona un ejemplo de un fármaco activo en SEQ ID NO: 229-264, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente del 75 % al 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264 tal como aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[00265] Un "profármaco no escindible", como se usa en el presente documento, se refiere a un ProTriTAC como se ha descrito anteriormente donde el enlazador escindible se reemplaza por un enlazador no escindible (*por ejemplo*, un enlazador como en SEQ ID NO: 696). Se proporciona un ejemplo de un fármaco activo en SEQ ID NO: 229-264, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente del 75 % al 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264, tal como aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o el 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

[00266] En un armazón no tipo sándwich beta (*por ejemplo*, un DARPIN®, un AFFIMER®, un aficuerpo), los "bucles no de CDR" se refieren a un área que es (1) susceptible de aleatorización de secuencia para permitir especificidades modificadas por ingeniería genética a un segundo antígeno, y (2) distal a la región o regiones determinantes de especificidad primarias típicamente usadas en el armazón para permitir acoplamiento simultáneo del armazón a ambos antígenos sin interferencia estérica. Para este fin, la región o regiones determinantes de especificidad primaria se pueden definir usando el marco establecido en la publicación de Skrlec 2015 (*Tendencias en biotecnología*, 33:408-418). Un extracto del marco se enumera a continuación:

Tabla 2	
Armazón	Región o regiones determinantes de especificidad primaria
Aficuerpo	13 restos en dos hélices
AFFIMER®	12-36 restos
Anticalina	Cuatro bucles (hasta 24 aa)
Avimer	11 restos
Centirina	13 restos
DARPIN®	7 restos en cada n-repetición, u 8 restos en cada n-repetición
Finomero	6 restos en el bucle RT y n-Src
Dominio de Kunitz	1-2 bucles

[00267] "Receptor de antígeno quimérico" o "CAR" o "CARs", como se usa en el presente documento, se refiere a receptores diseñados que proporcionan especificidad de antígeno a las células (*por ejemplo*, linfocitos T). Los CAR comprenden múltiples dominios, *por ejemplo*, al menos un dominio de unión a antígeno diana, un dominio transmembrana, uno o más dominios coestimuladores y un dominio de señalización intracelular. Cada dominio puede estar conectado por un enlazador. Un "ProCAR", como se usa en el presente documento, se refiere a un CAR condicionalmente activable, que comprende un dominio de unión a TROP2 de esta divulgación.

EJEMPLOS

[00268] La solicitud se puede entender mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se proporcionan como realizaciones ilustrativas de la solicitud. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones y de ninguna manera deben interpretarse, sin embargo, como limitativos del amplio alcance de la solicitud.

Ejemplo 1: Detección de biblioteca de expresión en fagos para la identificación de dominios de unión a TROP2

[00269] Las llamas se inmunizaron con proteína dímera de TROP2 purificada expresada en células 293. Se construyó una biblioteca de expresión en fagos para la expresión de dominios de anticuerpos variables pesados a partir de células B circulantes aisladas de las llamas inmunizadas (van der Linden *et al.* 2000. *J Immunol Métodos* 240: 185-195). Los clones de fago se seleccionaron para unirse al dímero de TROP2 expresando proteínas anti-TROP2 de llama en *E. coli*, preparando extractos periplásmicos y realizando ELISA colorimétricos. Se identificaron 52 secuencias únicas de cadena pesada únicas (SEQ ID NO: 1 a 52) que produjo una señal en el cribado de ELISA en relación con el control con proteína TROP2 humana o de macaco cangrejero (Tabla 3). Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 para estos dominios variables pesados son, respectivamente, SEQ ID NO: 58 a 109, 115 a 166 y 172 a 223.

Tabla 3: Unión de anticuerpos anti-TROP2 de llama a TROP2 humana o de macaco cangrejero en un ensayo ELISA

Nombre de la secuencia	ELISA huTROP2	ELISA cyTROP2	huTROP2/control	cyTROP2/control
2TRL2	1,0	1,8	6,0	11,1
2TRL4	2,0	4,1	15,5	32,1
2TRL11	1,5	2,6	7,3	12,2
2TRL12	1,3	1,9	8,9	13,5
2TRL20	1,2	2,3	7,3	14,1
2TRL22	2,6	3,6	3,2	4,6
2TRL29	1,7	2,7	4,9	7,6
2TRL31	1,5	2,6	9,3	15,7
2TRL33	2,1	3,5	6,3	10,7
2TRL37	1,5	2,5	4,4	7,5
2TRL50	1,4	2,1	3,3	5,0
2TRL55	1,7	2,3	8,7	11,5
2TRL61	0,5	1,0	5,0	10,7
2TRL70	1,2	2,1	4,7	8,4
2TRL74	1,4	2,4	6,0	10,6
2TRL76	3,1	5,4	21,3	37,8
2TRL78	3,7	4,9	4,6	6,1
2TRL84	1,5	2,1	7,5	10,9
2TRL89	0,8	1,3	6,9	10,9
2TRL92	0,8	1,3	3,4	5,3
3TRL3	1,1	2,1	11,4	22,3
3TRL9	0,8	1,4	6,3	10,5
3TRL10	1,7	2,7	7,4	12,1
3TRL16	1,3	2,5	13,1	24,7
3TRL24	1,6	3,0	10,3	18,9

Nombre de la secuencia	ELISA huTROP2	ELISA cyTROP2	huTROP2/control	cyTROP2/control
3TRL25	0,7	1,5	9,2	19,5
3TRL29	3,0	5,0	16,5	27,3
3TRL56	1,5	2,5	9,7	16,6
3TRL58	2,8	4,5	12,3	19,3
3TRL68	1,4	2,4	6,0	10,3
3TRL73	3,2	4,2	3,9	5,3
3TRL77	1,6	2,8	10,3	18,4
3TRL78	1,9	2,9	4,8	7,3
3TRL87	1,2	2,9	8,3	20,7
2TRL1	3,6	5,0	21,3	29,5
2TRL5	2,8	4,1	12,1	18,1
2TRL8	3,7	5,1	4,5	6,2
2TRL10	3,9	6,0	9,3	14,1
2TRL27	3,8	5,0	3,8	5,0
2TRL46	4,0	5,0	25,4	31,5
2TRL69	0,8	1,5	8,8	15,4
2TRL94	4,0	4,9	15,4	19,0
2TRL79	1,5	2,1	4,5	6,0
2TRL81	1,8	2,5	5,0	6,8
2TRL18	2,0	4,3	16,1	34,1
3TRL27	0,6	1,1	4,4	8,2
2TRL28	0,5	1,4	4,8	14,0
2TRL39	0,7	2,1	5,8	17,8
3TRL82	2,3	4,0	6,6	11,5
2TRL68	0,4	1,1	4,2	10,7
2TRL64	1,9	3,7	6,7	13,1
3TRL53	1,9	2,5	3,5	4,5

[00270] Los valores numéricos en la Tabla 1 representan las lecturas de absorbancia para el ELISA colorimétrico.

Ejemplo 2: Incorporación de anticuerpos de dominio único sólo de cadena pesada de unión a TROP2 en proteínas de fusión y ensayos de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T

[00271] Las secuencias de anticuerpo anti-TROP2 se clonaron en construcciones de ADN para la expresión de proteínas de fusión recombinantes (SEQ ID NO: 229 a 258). Las secuencias codificantes de las proteínas de fusión contenían un péptido señal para la expresión celular secretada, un trozo para imitar la versión escindida de un reclutador de linfocitos T condicionalmente activo (SEQ ID NO: 495), fragmento de scFv de anticuerpo anti-CD3 humanizado (SEQ ID NO: 494), uno de los dominios variables de anticuerpo anti-TROP2 (SEQ ID NO: 1 a 52), y una repetición de secuencias de seis histidina (SEQ ID NO: 496). Se insertó una secuencia enlazadora en las uniones entre dominios de anticuerpo (SEQ ID NO: 497). Estas construcciones de proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2 se transfectaron en células Expi293

(Life Technologies). La cantidad de proteína de fusión en el medio acondicionado de las células Expi293 transfectadas se cuantificó usando un instrumento Octet con puntas de Proteína A o anti-6xHis usando una proteína de fusión de peso molecular similar a las proteínas anti-CD3/anti-TROP2 como un patrón.

[00272] Los medios acondicionados se analizaron en un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T (TDCC) (Nazarian AA, Archibeque IL, Nguyen YH, Wang P., Sinclair AM, Powers DA. 2015. *J Biomol Screen*. 20:519-27). En este ensayo, las células diana, ya sea células H292 marcadas con luciferasa o células HT1376 marcadas con luciferasa, que ambas expresan TROP2, se combinaron con linfocitos T humanos purificados y una titulación de la proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2. Si una proteína de fusión dirige los linfocitos T para matar las células diana, la señal en un ensayo de luciferasa realizado a las 48 horas después de comenzar el experimento debería disminuir. Las figuras 1 a 12 tienen gráficos de resultados de viabilidad de TDCC. Los valores de CE50 del ensayo de TDCC se enumeran en la Tabla 4. La molécula más potente tenía un valor de CE50 de 37,4 pM con células H292 y de 152 pM con células H1376. Un control negativo para los ensayos de TDCC fue una proteína anti-GFP/anti-albúmina/anti-CD3, y esta proteína no dirigió a los linfocitos T para matar las células H292 excepto por una ligera actividad a la concentración más alta sometida a prueba (*por ejemplo.*, FIG. 5 y 11).

Tabla 4: Valores de CE50 para la destrucción de linfocitos T redirigida de células H292 por proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 que contienen secuencias anti-TROP2 de llama.

Aglutinante de TROP2	CE50 (pM) de H292	CE50 (pM) de H1376
3TRL3	618	1800
2TRL92	1430	2620
3TRL77	676	2000
2TRL4	353	965
2TRL76	37,4	152
3TRL16	5070	4070
3TRL29	438	996
3TRL58	1960	3640
2TRL31	1350	2740
2TRL70	n/a	n/a
3TRL56	1720	2110
3TRL87	6470	7410
2TRL33	287	714
2TRL1	1650	8150
2TRL5	n/a	n/a
2TRL8	4070	8490
2TRL27	6730	n/a
2TRL46	6800	n/a

Aglutinante de TROP2	CE50 (pM) de H292	CE50 (pM) de H1376
2TRL69	n/a	n/a
2TRL94	2780	n/a
2TRL79	59,8	209
2TRL81	208	624
2TRL18	7450	n/a
3TRL27	8750	n/a
2TRL28	n/a	n/a
2TRL39	5330	n/a
3TRL82	n/a	n/a
2TRL68	n/a	n/a
2TRL64	n/a	n/a
3TRL53	94,3	362

[00273] n/a: actividad insuficiente para calcular una CE50 usando las concentraciones de proteína sometidas a prueba.

Ejemplo 3: Humanización de anticuerpos de unión a TROP2 y ensayos de citotoxicidad celular dependiente de linfocitos T

[00274] Cuatro de las secuencias de anticuerpo anti-TROP2 de llama (SEQ ID NO: 16, 41, 43 y 52) se humanizaron injertando sus secuencias de CDR en secuencias de línea germinal humana, mientras se retienen algunas secuencias marco de llama para garantizar que los anticuerpos no pierdan actividad (SEQ ID NO: 53 a 57). Estas secuencias humanizadas se clonaron en construcciones de expresión para la expresión como proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 (SEQ IDS 259 a 263) en células Expi293, junto con sus construcciones parentales, como anteriormente. La cantidad de proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 en el medio acondicionado se cuantificó como antes. El medio acondicionado que contiene las proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 se usó en un ensayo de TDCC como antes solo usando las líneas H292, HT1376 o HCC70 marcadas con luciferasa que expresan TROP2. Los resultados del ensayo de TDCC se representan en las figuras 13 a 18, y los valores de CE50 para la destrucción dirigida de linfocitos T se enumeran en la Tabla 3. Se observó una potente destrucción de linfocitos T dirigida tanto con los anticuerpos TROP2 de llama como humanizados.

[00275] El aglutinante humanizado 2TRH79B se usó para preparar una proteína de fusión que contiene un dominio anti-ALB que contiene una máscara de bucle no de CDR que bloquea la unión de CD3 conectada al aglutinante anti-CD3 y anti-TROP2 2TRH79B mediante un enlazador escindible (SEQ ID NO: 498). El aglutinante de 2TRH79B junto con sus construcciones parentales se purificaron y cuantificaron. Las proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 se usaron en un ensayo de TDCC usando tres diferentes líneas celulares HCC70, HPAF-II o CAL27 que expresan

TROP2 marcadas con luciferasa. Los resultados del ensayo de TDCC se representan en las figuras 19-21, y los valores de CE50 para la destrucción dirigida de linfocitos T se enumeran en la Tabla 5.

[00276] Tabla 5: Valores de CE50 para la destrucción de linfocitos T redirigida de células H292, HT1376 o HCC70 por proteínas de fusión anti-CD3/anti-Trop2 que contienen secuencias anti-Trop2 de llama o humanizadas.

Aglutinante de TROP2	CE50 (pM) de H292	CE50 (pM) de HT1376	CE50 (pM) de HCC70
3TRL53	48,7	20,5	57,7
3TRH53	108,6	53,4	119,1
2TRL76	8,8	4,6	10,1
2TRH76	217	150,8	328,8
2TRL79	9,7	13,3	3,2
2TRH79	23,5	37,5	10,1
2TRL81	8,3	14	2,7
2TRH81	15,3	27,1	4,4

[00277] El aglutinante humanizado 2TRH79B es una variante de secuencia del aglutinante 2TRH79. Se produjo una construcción de ADN que contiene una secuencia de dominio anti-ALB que contiene una máscara de bucle no de CDR que bloquea la unión de CD3 conectada por un enlazador escindible (L040) a las secuencias de aglutinante anti-CD3 y anti-TROP2 2TRH79B (SEQ ID NO: 498). Esta construcción de fusión se transfectó en células Expi293 y el medio acondicionado se recogió días después. La proteína de fusión anti-ALB:anti-CD3:antiTROP2 2TRH79B se purificó mediante cromatografía de proteína A usando condiciones de unión y elución estándar. También se transfectaron en células Expi293 para la expresión de proteínas construcciones de ADN que contenían un dominio anti-CD3 unido por un enlazador GGGGSGGGS a una de tres secuencias anti-TROP2: la secuencia de aglutinante anti-TROP2 de llama 2TRL79 y las secuencias de aglutinante anti-TROP2 humanizadas 2TRH79 y 2TRH79B. Cinco días después de la transfección, se recogieron los medios de cultivo y las secuencias anti-CD3:anti-TROP2 se purificaron mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) usando métodos estándar. La proteína de fusión anti-ALB:anti-CD3:antiTROP2 2TRH79B y las secuencias anti-CD3:anti-TROP2 se analizaron en un ensayo de TDCC usando tres líneas celulares HCC70, HPAF-II o CAL27 diferentes que expresan TROP2 marcadas con luciferasa, en presencia de 15 mg/ml de seroalbúmina humana. Los resultados del ensayo de TDCC se representan en las figuras 19-21, y los valores de CE50 para la destrucción dirigida de linfocitos T se enumeran en la Tabla 4. Entre las proteínas anti-CD3:anti-TROP2 con dominios anti-TROP2 humanizados, la proteína 2TRH79B era más potente y era solo 2 a 3 veces menos potente que la proteína con un dominio anti-TROP2 de llama. Comparando los valores de CE50 (Tabla 6) de las

proteínas anti-CD3:anti-TROP2 2TRH79B y anti-ALB:anti-CD3:anti-TROP2, se puede ver que la proteína anti-ALB:anti-CD3:anti-TROP (2TRH79B L040 ProTriTAC) destruye con una potencia reducida de 36 a 173 veces en comparación con la proteína anti-CD3:anti-TROP2 (2TRH79B), lo que demuestra que la presencia del dominio anti-ALB, con su máscara de bucle no de CDR que se une al dominio anti-CD3, reduce la actividad de TDCC. Es posible que esta diferencia pudiera ser incluso mayor si las líneas celulares usadas en este ensayo tuvieran actividad de proteasa que activara parcialmente la proteína anti-ALB:anti-CD3:anti-TROP.

Tabla 6: Valores de CE50 para la destrucción de linfocitos T redirigida de células HCC70, HPAF-II o CAL27 por proteínas de fusión anti-CD3/anti-Trop2 que contienen secuencias anti-Trop2 de llama o humanizadas.

Aglutinante de TROP2	CE50 (pM) de HCC70	CE50 (pM) de HPAF-II	CE50 (pM) de CAL27
2TRL79	5,7	4,5	nd
2TRH79	25,9	14,8	nd
2TRH79B	16,2	9,7	11,3
2TRH79B L040 ProTriTAC	1112	1681	409,6

[00278] nd = sin datos.

Ejemplo 4: Demostración de tolerabilidad mejorada en ratón, conferida por proteínas de fusión anti-CD3/anti-TROP2 ilustrativas

[00279] Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Harpoon Therapeutics (número de protocolo HAR-001-2019). Los animales se compraron en The Jackson Laboratory y luego se alojaron en una instalación de animales libre de patógenos ubicada en Harpoon Therapeutics de acuerdo con las pautas de IACUC. Todos los estudios se realizaron en ratones hembra NSGTM (NOD-SCID IL2Rgammanull) de 6, 7 u 11 semanas de edad con n = 5-10 ratones por grupo. Para cada experimento, los ratones tenían la misma edad.

[00280] Una mezcla de células tumorales humanas que expresan Trop2, o bien HCC70 (10E6), CAL27 (5E6) o HPAF II (10E6) y linfocitos T humanos activados y expandidos (5E6, 2.5E6 o 5E6, respectivamente) en una relación E:T de 1:2 se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSGTM (día 0). Para el experimento de xenoinjertos de HCC70 (exp) 1 y 2, el tratamiento siguió 7 días después del implante (Día 7) una vez que se establecieron los tumores (promedio de 184 mm³ (HCC70 exp 1) o 155 mm³ (HCC70 exp 2). Para xenoinjertos de CAL27, el tratamiento comenzó una vez que se establecieron los tumores (promedio de 120 mm³) el día 4. Para xenoinjertos de HPAF II, el tratamiento comenzó una vez que se establecieron los tumores (promedio de 128 mm³) el día 4. A los ratones se les administró una dosis intraperitoneal repetida

(qdx14) del control negativo, no Trop2 dirigido a anti-GFP TriTAC, anti-Trop2 2TRL79 (aglutinante de llama) ProTriTAC Linker 040, anti-Trop2 2TRH79 (aglutinante humanizado) ProTriTAC Linker 040, o anti-Trop2 2TRH79B (aglutinante humanizado) ProTriTAC Linker 040. El crecimiento tumoral se monitorizó al menos dos veces por semana como se indica. El volumen tumoral promedio mostrado se calculó a partir de las mediciones tomadas el último día de cada estudio de modelo de xenoinjerto. Las estadísticas representan ANOVA unidireccional de RM con prueba post-hoc de Dunnett, todos los grupos en comparación con el control negativo, anti-GFP TriTAC. Los resultados de cada estudio de roedores de xenoinjerto terapéutico de Admix se representan en las figuras 22-26 y las estadísticas para cada estudio de modelo de xenoinjerto se informan en la Tabla 7.

Tabla 7: Valores P de múltiples estudios de xenoinjerto de roedores con proteínas de fusión anti-CD3/anti-Trop2 que contienen secuencias anti-TROP2 humanas 2TRL79, 2TRH79 y 2TRH79B L040 ProTriTAC

Xenoinjerto	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Volumen tumoral promedio (mm ³)	Valor de P	
HCC70 ¹ (mama)	α Trop2 2TRL79 ProTriTAC	3	0	****	<0,0001
		0,3	0	****	<0,0001
		0,03	0	****	<0,0001
	α GFP TriTAC	0,3	681	n/a	n/a
HCC70 ² (mama)	α Trop2 2TRL79 ProTriTAC	0,1	0	****	<0,0001
		0,01	14	****	<0,0001
		0,001	417	ns	ns
	α Trop2 2TRH79 ProTriTAC	1	0	****	<0,0001
		0,1	0	****	<0,0001
		0,01	439	ns	ns
		0,001	503	ns	ns
	α GFP TriTAC	0,3	489	n/a	n/a
CAL27 (cabeza y cuello)	α Trop2 2TRH79B ProTriTAC	3	0	****	<0,0001
		0,3	0	****	<0,0001
		0,03	224	*	0,0215
		0,003	391	ns	ns
	α GFP TriTAC	0,3	426	n/a	n/a
HPAF-II (páncreas)	α Trop2 2TRH79B ProTriTAC	3	0	****	<0,0001
		0,3	0	****	<0,0001
		0,03	0	****	<0,0001
		0,003	ns	ns	ns
	α GFP TriTAC	0,3	956	n/a	n/a

[00281] Experimento de HCC70 1 2 Experimento de HCC70 2 α : anti; E:T; relación de efector a célula diana; n/a: No aplicable; ns: no estadísticamente significativo ($P > 0,05$); y P: valor de probabilidad.

Ejemplo 5: Actividad antitumoral potente, comparable conseguida por equivalentes molares de profármaco y fármaco activo

[00282] Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Harpoon Therapeutics (número de protocolo HAR-001-2019). Los animales se compraron en The Jackson Laboratory y luego se alojaron en una instalación de animales libre de patógenos ubicada en Harpoon Therapeutics de acuerdo con las pautas de IACUC. Todos los estudios se realizaron en ratones hembra NSGTM (NOD-SCID IL2Rgammanull) de 6, 7 u 11 semanas de edad con $n = 5-10$ ratones por grupo. Para cada experimento, los ratones tenían la misma edad.

Una mezcla de células HCC70 (10E6) que expresan Trop2 y linfocitos T humanos activados y expandidos (5E6) en una relación E:T de (2,5 millones:5 millones) se implantó por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones NSGTM (Día 0). Para el experimento de xenoinjertos de HCC70 (exp) 1 y 2, el tratamiento siguió 7 días después del implante (Día 7) una vez que se establecieron los tumores (promedio de 184 mm³ (HCC70 exp 1) o 155 mm³ (HCC70 exp 2). A los ratones se les administró una dosis intraperitoneal repetida (qdx14) de la dosis de control (300 µg/kg), profármaco (30 µg/kg, 300 µg/kg o 3000 µg/kg) o el fármaco activo (22,5 µg/kg o 225 µg/kg) respectivamente. El crecimiento tumoral se monitorizó al menos dos veces por semana como se indica. El volumen tumoral promedio mostrado se calculó a partir de las mediciones tomadas el último día de cada estudio de modelo de xenoinjerto. Las estadísticas representan ANOVA unidireccional de RM con prueba post-hoc de Dunnett, todos los grupos en comparación con el control negativo, anti-GFP TriTAC. Los resultados del estudio de roedores de xenoinjerto terapéutico de Admix se representan en la figura 27. Los resultados mostraron los equivalentes molares de profármaco y fármaco activo, mostraron una actividad antitumoral potente comparable (Figura 27).

Ejemplo 6: Determinación de la actividad de unión y la reactividad cruzada de especies de la molécula TroP2 ProTriTAC Linker 40 evaluada por interferometría de biocapa

[00283] La interferometría de biocapa (BLI) es un método analítico bien establecido que se utiliza para determinar la cinética de unión de interacciones biomoleculares específicas. Una molécula, el ligando diana, se etiqueta o modifica para permitir la captura y presentación específicas a una segunda molécula, el analito, en solución. En algunos usos, el ligando podría expresarse como una proteína de fusión con repeticiones de histidina, un dominio constante Fc de anticuerpo, o

conjugado con una molécula pequeña tal como biotina. Durante la fase de carga, el ligando se captura en una punta de biosensor de fibra de vidrio derivatizada químicamente con agentes capaces de unirse con alta afinidad al ligando etiquetado, es decir, ácido nitrilotriacético quelante de metales, un anticuerpo monoclonal anti-Fc o estreptavidina por los ejemplos anteriores. Usando un instrumento como el Octet RED96 (Sartorius), la luz blanca se proyecta por la punta del biosensor y se refleja desde dos superficies, una capa de referencia y una superficie biocompatible con ligando inmovilizado. La distancia de reflexión a la capa de referencia es constante, mientras que la distancia de reflexión desde el ligando inmovilizado en la superficie varía tras la asociación o disociación del analito, lo que conduce a la interferencia de las ondas de luz que dan como resultado cambios en la amplitud medida a lo largo del tiempo. Los sensogramas de unión generados a partir de diluciones en serie de concentraciones de analito conocidas se ajustan globalmente a un modelo de unión uno a uno. Este ajuste global determina la constante de tasa de asociación (k_{on}) y la constante de tasa de disociación (k_{off}) usadas para calcular una constante de disociación de unión (K_D). Debido a que se sabe que la interacción estreptavidina-biotina se encuentra entre las afinidades biomoleculares más altas identificadas, y para minimizar las contribuciones de confusión de otras químicas de ligando/superficie, todos los ligandos en este estudio estaban biotinilados.

[00284] Para caracterizar mejor y ayudar a identificar especies toxicológicas relevantes, la cinética de unión y la afinidad de una molécula TroP2 ProTriTAC Linker 40 ((2TRH79B, se evaluaron para el transductor de señal de calcio asociado a tumor 2 (Trop2). Se prepararon derivados biotinilados de ligandos diana de especies de primates humanos y no humanos (NHP) (cyno). Como tal, la unión de 2TRH79B y 2TRH79 a ligandos diana biotinilados se evaluó mediante interferometría de biocapa (BLI) en ausencia o presencia de calcio. Las figuras 28A-28B demostraron que 2TRH79B se une con afinidad comparable a Trop2 humano (figura 28A) y macaco cangrejero (cyno) (figura 28B) en ausencia o presencia de calcio (47-51 nM o 50 nM, respectivamente). La Tabla 8 resume los hallazgos del estudio de cinética de unión.

Tabla 8: Valores de cinética de unión de proteínas de fusión anti-CD3/anti-Trop2 que contienen secuencias humanas anti-TROP2 2TRH79B, L040 ProTriTAC con Trop2 humana y Cyno

	TroP2 humana	TroP2 cyno
k_{on} (1/Ms) e5	0,9	0,8
K_{off} (1/s)	$4,1 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-3}$
K_D (nM)	48	73

[00285] Adicionalmente, la cinética de unión y la afinidad de una segunda molécula de TroP2 ProTriTAC Linker 40 (2TRH79), se evaluó una construcción relacionada para Trop2 humana y

cyno en ausencia o presencia de calcio por BLI, y los resultados fueron similares. 2TRH79 se unió con afinidad comparable a Trop2 humana y cyno en ausencia o presencia de calcio (168-186 nM o 122-179 nM, respectivamente) (datos no mostrados).

Ejemplo 7: Estudio de aumento de dosis de un mes/dosis máxima tolerada

[00286] En este estudio de aumento de dosis/dosis máxima tolerada, la molécula TroP2 ProTriTAC Linker 40 (2TRH79B) se usa para inyección intravenosa (bolo lento) en macacos cangrejeros.

[00287] Los objetivos principales de esta Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) se cumplen, el estudio de dosis repetidas crecientes fue para evaluar la toxicidad potencial y la exposición sistémica de TroP2 ProTriTAC, cuando se administra por inyecciones intravenosas (iv) de bolo lento en los días 1, 8, 15 y 22 a 20, 60, 180 y 540 µg/kg, respectivamente, a los macacos cangrejeros. La **figura 29** muestra el diseño experimental. Además, se determinaron las características toxicocinéticas (TK) de TroP2 ProTriTAC. Los criterios de valoración del estudio incluyeron: la mortalidad, las observaciones clínicas (diarias en el lado de la jaula, posteriores a la dosis y detalladas semanalmente), los pesos corporales, el consumo cualitativo de alimentos, los parámetros de patología clínica (hematología, coagulación, química clínica y análisis de orina), los parámetros bioanalíticos y TK, los análisis de citocinas, los pesos de órganos y exámenes macroscópicos y microscópicos.

[00288] TroP2 ProTriTAC se toleró bien hasta 540 µg/kg, la dosis más alta probada. La PK se evaluó capturando con un Ab anti-idiotipo biotinilado que reconoce el dominio αCD3 y detectando con un anticuerpo anti-idiotipo sulfomarcado producido contra el dominio αALB. La **figura 30** demuestra que TroP2 ProTriTAC muestra una farmacocinética, semivida y acumulación sistémica favorables. Los cambios hematológicos consistieron en una disminución mínima a moderada de neutrófilos en todos los niveles de dosis, así como disminuciones transitorias en linfocitos y basófilos en la semana 3 del estudio. No hubo hallazgos notables en las citocinas plasmáticas (IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-8, TNF-α) a lo largo del estudio, sin hallazgos notables de la coagulación, química clínica o parámetros de análisis de orina y sin hallazgos histopatológicos notables basados en el peso del órgano y el examen macroscópico.

TABLA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
1	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL2	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAASRRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVK GRFAISTDDAKNTVYQLQMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
2	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL4	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYADSV KGRFTISTDNAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCA AGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
3	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL11	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
4	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL12	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTPTVTVSS
5	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL20	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
6	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL22	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAVSGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
7	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL29	QVQLQESGGGVVQAGGSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
8	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL31	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTGGYDYWGQGTQVTVSS
9	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL33	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNANTVYLQMNRLKPEDTAVYYCAAG APRKWTDGYAYWGQGTQVTVSS
10	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL37	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
11	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL50	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVK GRFAISTDDAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS
12	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL55	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSTEVTNYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAYYYCAA GAPRTWTRGYDYWGQGTQVTVSS
13	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL61	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGANWGSDATYYADSV

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			KGRFTISTDNAKNTVYVLQMDSLKPEDTAVYYCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
14	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL70	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASVRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWVSGSTYYTDSVKGRFTFSRDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTDGYDYWGQGTQVTVSS
15	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL74	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSTEVTNYADSVKGRFTISTDNAKNTVYVLQMNSLKPEDA AVYYCAA GAPRTWTRGYDYWGQGTQVTVSS
16	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL76	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFSSRVMGWFRQYPGKEREFVAGINTGSDATYYADSVKGRFTISTDNAKTISTDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
17	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL78	QVQLQESGGGLAQPGGSLRLSCVASGRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYVLQMDSLKPEDTAVYYCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
18	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL84	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
19	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL89	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRVMGWLRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
20	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL92	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFSSRVVGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVKG RFAISTDDAKNTVYVLQMNNLKPEDTAVYYCAAG APPTWTDGYDYWGQGTQVTVSS
21	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL3	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVGGINWTTDATSYAESVKGRFTISTDNAKDTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPPRWTDGYEYWGQGTQVTVSS
22	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL9	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLTCAASRRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYVLQMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS
23	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL10	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASRRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYVLQMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS
24	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL16	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASGRTFSSRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
25	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL24	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
26	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL25	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYADSV KGRFTISTDNAKNTVYLMMDSLKPEDTAVYYCA AGAPRKWTDGYDYQGQGTQVTVSS
27	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL29	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYADSV KGRFTISTDNAKNTVYLMMDSLKPEDTAVYYCA AGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
28	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL56	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASRRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVK GRFAISTDDAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS
29	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL58	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCALSGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYADSV KGRFTISTDNAKNTVYLMMDSLKPEDTAVYYCA AGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
30	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL68	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDVAYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
31	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL73	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA GAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSS
32	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL77	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRRTFSSRV GWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVKGR FAISTDDAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCAAG APPTWTDTRYDYWGQGTQVTVSS
33	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRRTFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSSTGTYYVDSVK GRFAISTDDAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCAA GAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSS
34	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL87	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSRV MGWFRQAPGKEREFVAGINWSTEVTNYADSVK GRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDAAVYYCAA GAPRTWTRGYDYWGQGTQVTVSS
35	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRISAM AWYRQAPGNQRELVASIIDGTTNYAESVKGRFT ISRDNKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNVGAR MHWGPTRDYWGQGTQVTVSS
36	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRISAM AWYRQAPGNQRELVASIISDGSANYAESVNGRF

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			TISRDNAKNTVYLMNNLKPEDTADYYCNVGA RMHWGPTRDYWGQGTQVTVSS
37	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRISAM AWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYAESVKRFTI SRDNAKNMVYLMNNLKPEDTAVYSCNVGAR MYWGPTRDYWGQGTQVTVSS
38	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRISAM AWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYAESVKRFTI SRDNAKNTAYLMNNLKPEDTAVYYCNVGAR MYWGPTRDYWGQGTQVTVSS
39	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRISAM AWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYVESVKRFTI SRDNAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNVGAR MHWGPTRDYWGQGTQVTVSS
40	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL46	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRISAM AWYRQAPGNQRELVASIADGSSNYAESVKRFTI SRDNAKNTVYLMNNLKPEDTAGYYCNVGAR MHWGPTRDYWGQGTQVTVSS
41	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL69	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRISAM AWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYVESVRGRFT ISRDNAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNVGAR MHQGPTRDYWGQGTQVTVSS
42	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL94	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRISAM AWYRQAPGNQRELVASIIDGSTNYAESVKRFTIS RDNAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNVGARM HWGPTRDYWGQGTQVTVSS
43	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL79	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFGSYT TGWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSVKR FTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAGP GITPNPRTRTYDYWGQGTQVTVSS
44	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL81	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTIGSYTT GWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSVKRF TISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAGPG ITPNPRTRTYDYWGQGTQVTVSS
45	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTFSNLG MGWVRQAPGKERELIAGITKSGSSVYYADSVKR FTISRDNAKNTVFLQMNSLKPADTSVYYCGASPL IGSSWLTDNRNKFYWGQGTQVTVSS
46	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL27	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVVSOGGTFSNLA MGWVRQAPGKEREFVVAISKSGSSVYYADSVKG RFTISRDNAKNTVFLQMNSLKPADTSVYYCGASP LIGSSWLTDNRNKFYWGQGTQVTVSS
47	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL28	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRFTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAISWSDSSTYYADSVKG RFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAT AYYYCSGYGCYDRARVYDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
48	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL39	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASERTFRQYA MGWFRQAPGKEREFVATISWSGGRTYYADSVK GRFTISRDNNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA SNYYCAGYGCYDRASLFDYWGQGTQVTVSS
49	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL82	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGINAM GWYRQGPQKQRDLVAVTTSAGMTSYADSVKGR FTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNLRS PYITALNYWGQGTQVTVSS
50	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL68	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSNHD MAWFRQAPGKEREFIAAISWSGGNTDYVDFVKG RFTSSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTALYFCAAV RVAGRSYEYHYWGQGTQVTVSS
51	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRL64	QVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCVASRRTFNMGW FRQAPGKEREFVAAIKESGGDAYYADSVKGRFFI SRDNAKNMVYLQMNNLKPEDTAVYSCAADPRL IIPSGNSYWYWGQGTQVTVSS
52	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRL53	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAITRSGGSTLYADSVKG RFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAS GTGWPLEYEYDYWGQGTQVTVSS
53	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRH76	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSRVM GWFRQYPPGKEREFVAGINTGSDATYYADSVKRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGAP RKWTDGYDYWGQGT LTVSS
54	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRH79	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSYTT GWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGP GITPNPRTRTYDYWGQGT LTVSS
55	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRH79B	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGSYTT GWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGP GITPNPRTRTYDYWGQGT LTVSS
56	dominio variable de anticuerpo TROP2	2TRH81	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIGSYTT GWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGP GITPNPRTRTYDYWGQGT LTVSS
57	dominio variable de anticuerpo TROP2	3TRH53	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVAAITRSGGSTLYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAS GTGWPLEYEYDYWGQGT LTVSS
58	CDR1	2TRL2	RRTFSSR
59	CDR1	2TRL4	GRTFSSR
60	CDR1	2TRL11	GRTFSSR
61	CDR1	2TRL12	GRTFSSR
62	CDR1	2TRL20	GRSFSSR
63	CDR1	2TRL22	GRTFSSR

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
64	CDR1	2TRL29	GRTFSSR
65	CDR1	2TRL31	GRTFSSR
66	CDR1	2TRL33	GRSFSSR
67	CDR1	2TRL37	GRTFSSR
68	CDR1	2TRL50	RRTFSSR
69	CDR1	2TRL55	GRTFSSR
70	CDR1	2TRL61	GRTFSSR
71	CDR1	2TRL70	VRTFSSR
72	CDR1	2TRL74	GRSFSSR
73	CDR1	2TRL76	GLTFSSR
74	CDR1	2TRL78	GRTFSSR
75	CDR1	2TRL84	GRTFSSR
76	CDR1	2TRL89	GRTFSSR
77	CDR1	2TRL92	RRTFSSR
78	CDR1	3TRL3	GRTFSSR
79	CDR1	3TRL9	RRTFSSR
80	CDR1	3TRL10	RRTFSSR
81	CDR1	3TRL16	GRTFSSR
82	CDR1	3TRL24	GRSFSSR
83	CDR1	3TRL25	GRTFSSR
84	CDR1	3TRL29	GRTFSSR
85	CDR1	3TRL56	RRTFSSR
86	CDR1	3TRL58	GRTFSSR
87	CDR1	3TRL68	GRTFSSR
88	CDR1	3TRL73	GRSFSSR
89	CDR1	3TRL77	RRTFSSR
90	CDR1	3TRL78	RRTFSSR
91	CDR1	3TRL87	GRSFSSR
92	CDR1	2TRL1	GSFTRIS
93	CDR1	2TRL5	GSFFRIS
94	CDR1	2TRL8	GSFTRIS
95	CDR1	2TRL10	GSFTRIS
96	CDR1	2TRL27	GSFFRIS
97	CDR1	2TRL46	GSFTRIS
98	CDR1	2TRL69	GSFFRIS
99	CDR1	2TRL94	GSFTRIS
100	CDR1	2TRL79	GRTFGSY
101	CDR1	2TRL81	GRTIGSY
102	CDR1	2TRL18	GGTFSNL
103	CDR1	3TRL27	GGTFSNL
104	CDR1	2TRL28	GRTFSSY
105	CDR1	2TRL39	ERTFRXY
106	CDR1	3TRL82	GSIFGIN
107	CDR1	2TRL68	GLTFSNH

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
108	CDR1	2TRL64	RRTFN
109	CDR1	3TRL53	GRTFSSY
110	CDR1	2TRH76	GRTFSSR
111	CDR1	2TRH79	GRTFGSY
112	CDR1	2TRH79B	GRTFGSY
113	CDR1	2TRH81	GRTIGSY
114	CDR1	3TRH53	GRTFSSY
115	CDR2	2TRL2	NWSSTG
116	CDR2	2TRL4	NWGSDA
117	CDR2	2TRL11	NWSSDA
118	CDR2	2TRL12	NWSSDA
119	CDR2	2TRL20	NWSSDA
120	CDR2	2TRL22	NWSSDA
121	CDR2	2TRL29	NWSSDA
122	CDR2	2TRL31	NWSSDA
123	CDR2	2TRL33	NWSSDA
124	CDR2	2TRL37	NWSSDA
125	CDR2	2TRL50	NWSSTG
126	CDR2	2TRL55	NWSTEV
127	CDR2	2TRL61	NWGSDA
128	CDR2	2TRL70	NWVSGS
129	CDR2	2TRL74	NWSTEV
130	CDR2	2TRL76	NTGSDA
131	CDR2	2TRL78	NWGSDA
132	CDR2	2TRL84	NWSSDA
133	CDR2	2TRL89	NWSSDA
134	CDR2	2TRL92	NWSSTG
135	CDR2	3TRL3	NWTTDA
136	CDR2	3TRL9	NWSSTG
137	CDR2	3TRL10	NWSSTG
138	CDR2	3TRL16	NWSSDA
139	CDR2	3TRL24	NWSSDA
140	CDR2	3TRL25	NWGSDA
141	CDR2	3TRL29	NWGSDA
142	CDR2	3TRL56	NWSSTG
143	CDR2	3TRL58	NWGSDA
144	CDR2	3TRL68	NWSSDV
145	CDR2	3TRL73	NWSSDA
146	CDR2	3TRL77	NWSSTG
147	CDR2	3TRL78	NWSSTG
148	CDR2	3TRL87	NWSTEV
149	CDR2	2TRL1	IIDGT
150	CDR2	2TRL5	ISDGS
151	CDR2	2TRL8	ISDGS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
152	CDR2	2TRL10	ISDGS
153	CDR2	2TRL27	ISDGS
154	CDR2	2TRL46	IADGS
155	CDR2	2TRL69	ISDGS
156	CDR2	2TRL94	IIDGS
157	CDR2	2TRL79	SWIGSS
158	CDR2	2TRL81	SWIGSS
159	CDR2	2TRL18	TKSGSS
160	CDR2	3TRL27	SKSGSS
161	CDR2	2TRL28	SWSDSS
162	CDR2	2TRL39	SWSGGR
163	CDR2	3TRL82	TSAGM
164	CDR2	2TRL68	SWSGGN
165	CDR2	2TRL64	KESGGD
166	CDR2	3TRL53	TRSGGS
167	CDR2	2TRH76	NTGSDA
168	CDR2	2TRH79	SWIGSS
169	CDR2	2TRH79B	SWIGSS
170	CDR2	2TRH81	SWIGSS
171	CDR2	3TRH53	TRSGGS
172	CDR3	2TRL2	GAPRTWTGGYDY
173	CDR3	2TRL4	GAPRKWTDGYDY
174	CDR3	2TRL11	GAPRKWTDGYDY
175	CDR3	2TRL12	GAPRKWTDGYDY
176	CDR3	2TRL20	GAPRKWTDGYDY
177	CDR3	2TRL22	GAPRKWTDGYDY
178	CDR3	2TRL29	GAPRKWTDGYDY
179	CDR3	2TRL31	GAPRKWTGGYDY
180	CDR3	2TRL33	GAPRKWTDGYAY
181	CDR3	2TRL37	GAPRKWTDGYDY
182	CDR3	2TRL50	GAPRTWTGGYDY
183	CDR3	2TRL55	GAPRTWTRGYDY
184	CDR3	2TRL61	GAPRKWTDGYDY
185	CDR3	2TRL70	GAPRTWTDGYDY
186	CDR3	2TRL74	GAPRTWTRGYDY
187	CDR3	2TRL76	GAPRKWTDGYDY
188	CDR3	2TRL78	GAPRKWTDGYDY
189	CDR3	2TRL84	GAPRKWTDGYDY
190	CDR3	2TRL89	GAPRKWTDGYDY
191	CDR3	2TRL92	GAPPTWTDGYDY
192	CDR3	3TRL3	GAPPRWTDGYEY
193	CDR3	3TRL9	GAPRTWTGGYDY
194	CDR3	3TRL10	GAPRTWTGGYDY
195	CDR3	3TRL16	GAPRKWTDGYDY

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
196	CDR3	3TRL24	GAPRKWTDGYDY
197	CDR3	3TRL25	GAPRKWTDGYDY
198	CDR3	3TRL29	GAPRKWTDGYDY
199	CDR3	3TRL56	GAPRTWTGGYDY
200	CDR3	3TRL58	GAPRKWTDGYDY
201	CDR3	3TRL68	GAPRKWTDGYDY
202	CDR3	3TRL73	GAPRKWTDGYDY
203	CDR3	3TRL77	GAPPTWTDYDY
204	CDR3	3TRL78	GAPRTWTGGYDY
205	CDR3	3TRL87	GAPRTWTRGYDY
206	CDR3	2TRL1	GARMHWGPTRDY
207	CDR3	2TRL5	GARMHWGPTRDY
208	CDR3	2TRL8	GARMYWGPTRDY
209	CDR3	2TRL10	GARMYWGPTRDY
210	CDR3	2TRL27	GARMHWGPTRDY
211	CDR3	2TRL46	GARMHWGPTRDY
212	CDR3	2TRL69	GARMHXGPTRDY
213	CDR3	2TRL94	GARMHWGPTRDY
214	CDR3	2TRL79	GPGITPNPRTRYDY
215	CDR3	2TRL81	GPGITPNPRTRYDY
216	CDR3	2TRL18	SPLIGSSWLTDNRKFGY
217	CDR3	3TRL27	SPLIGSSWLTDNRKFGY
218	CDR3	2TRL28	TAYYCSGYGCYDRARVYDY
219	CDR3	2TRL39	SNYYCAGYGCYDRASLFDY
220	CDR3	3TRL82	RSPYITALNY
221	CDR3	2TRL68	VRVAGRSYEHY
222	CDR3	2TRL64	DPRLIIPSGNSYWY
223	CDR3	3TRL53	SGTGWPLEYEYDY
224	CDR3	2TRH76	GAPRKWTDGYDY
225	CDR3	2TRH79	GPGITPNPRTRYDY
226	CDR3	2TRH79B	GPGITPNPRTRYDY
227	CDR3	2TRH81	GPGITPNPRTRYDY
228	CDR3	3TRH53	SGTGWPLEYEYDY
229	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL3	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHFANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTS SRVMGWFRQAPGKEREFVGGINWTTDATSYAES VKGRFTISTDNAKDTVYLMNSLKPEDTAVYYC

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			AAGAPPRWTDGYEYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
230	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL92	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFS SRVVGWFRQAPGKEREVAGINWSSTGTYYVDS VKGRFAISTDDAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYC AAGAPPTWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
231	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL77	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRRTFSS RVVGWFRQAPGKEREVAGINWSSTGTYYVDSV KGRFAISTDDAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCA AGAPPTWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
232	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL4	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTFS SRVMGWFRQAPGKEREVAGVNWGSDATYYA DSVKGRFTISTDNAKNTVYLQMDSLKPEDTAVY YCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHH HH*
233	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL76	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTFSS RVMGWFRQYPGKEREFVAGINTGSDATYYADS VKGRFTISTDNAKTISTDNAKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVS SHHHHHH*
234	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL16	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASGRTFSS RVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYADS VEGRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH *
235	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL29	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSS SRVMGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYA DSVKGRFTISTDNAKNTVYLQMDSLKPEDTAVY YCAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHH HH*
236	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL58	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCALSGRTFSS RVMGWFRQAPGKEREFVAGVNWGSDATYYAD SVKGRFTISTDNAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYY CAAGAPRKWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHHH H*
237	proteína de fusión anti-CD3/anti-	2TRL31	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
	TROP2		TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTS SRVMGWFRQAPGKEREVAGINWSSDATYYAD SVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYY CAAGAPRKWTGGYDYWGQGTQVTVSSHHHHH H*
238	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL70	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASVRTFS SRVMGWFRQAPGKEREVAGINWVSGSTYYTDS VKGRFTFSRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYC AAGAPRTWTDGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
239	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL56	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAASRRFTSS RVMGWFRQAPGKEREVAGINWSSTGTYYVDS VKGRFAISTDDAKNTVYLMNNLKPEDTAVYYC AAGAPRTWTGGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
240	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL87	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFS SRVMGWFRQAPGKEREVAGINWSTEVNTYADS VKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDAAVYYC

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			AAGAPRTWTRGYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
241	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL33	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFS SRVMGWFRQAPGKEREFVAGINWSSDATYYAD SVKGRFTISTDNANTVYLMNNLKPEDTAVYYC AAGAPRKWTDGYAYWGQGTQVTVSSHHHHHH *
242	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL1	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIIDGTTNYAESVK GRFTISRDNANTVYLMNNLKPEDTAVYYCNV GARMHWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
243	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL5	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIISDGSANYAESVN GRFTISRDNANTVYLMNNLKPEDTADYYCNV GARMHWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
244	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL8	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYAESVK GRFTISRDNAMVYLMNNLKPEDTAVYSCN VGARMYWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
245	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL27	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHFANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYVESVK GRFTISRDNAMNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNV GARMHWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
246	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL46	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHFANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIADGSSNYAESVK GRFTISRDNAMNTVYLMNNLKPEDTAGYYCNV GARMHWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
247	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL69	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHFANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIISDGSTNYVESVR GRFTISRDNAMNTVYLMNNLKPEDTAVYYCNV GARMHQGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
248	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL94	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFTRI SAMAWYRQAPGNQRELVASIIDGSTNYAESVK GRFTISRDNKNTVYLLQMNNLKPGLTAVYYCN VGARMHWGPTRDYWGQGTQVTVSSHHHHHH*
249	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL79	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTG SYTTGWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSV KGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCA AGPGITPNPRTTRYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH *
250	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL81	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRITGS YTTGWFRQAPGKEREFVAALSWIGSSTYYPDSV KGRFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYYCA AGPGITPNPRTTRYDYWGQGTQVTVSSHHHHHH *
251	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL18	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCEVSGGTFS NLGMGWVRQAPGKERELIAGITKSGSSVYYADS VKGRFTISRDNKNTVFLQMNSLKPADTSVYYC GASPLIGSSWLTDNRNKFYWGQGTQVTVSSHHH HHH*
252	proteína de fusión	3TRL27	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
	anti-CD3/anti-TROP2		GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVVGSTFS NLAMGWVRQAPGKEREFVVAISKSGSSVYYADS VKGRFTISRDNKNTVFLQMNSLKPADTSVYYC GASPLIGSSWLTDRNKFGYWGQGTQVTVSSHHH HHH*
253	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL28	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAASGRFTS SYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSDSSTYYADS VKGRFTISTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AATAYYCSGYGCYDRARVYDYWGQGTQVTVSS HHHHHH*
254	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL39	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASERTFR QYAMGWFRQAPGKEREFVATISWSSGRTYYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAASNYYCAGYGCYDRASLFDYWGQGTQVTVS SHHHHHH*
255	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL82	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			GGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGI NAMGWYRQGPQKQRDLVAVTTSAGMTSYADS VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYC NLRSPYITALNYWGQGTQVTVSSHHHHHHH*
256	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL68	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFS NHDMAWFRQAPGKEREFIAAISWSGGNTDYVDF VKGRFTSSRDNAKNTVYLMNSLKPEDTALYFC AAVRVAGRSYEHYWGQGTQVTVSSHHHHHHH*
257	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRL64	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCVASRRTFN MGWFRQAPGKEREFVAAIKESGGDAYYADSVK GRFFISRDNAMVYLMNNLKPEDTAVYSCAA DPRLIIPSGNSYWYWGQGTQVTVSSHHHHHHH*
258	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRL53	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSQVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTS SYAMGWFRQAPGKEREFVAITRSGGSTLYADS VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYC AASGTGWPLEYEEYDYWGQGTQVTVSSHHHH HH*
259	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRH76	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
			NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSS RVMGWFRQYPGKEREVAGINTGSDATYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAGAPRKWTDGYDYWGQGLTVTVSSHHHHHH*
260	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRH79	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGS YTTGWFRQAPGKEREVAAALSWIGSSTYYPDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AGPGITPNPRTRTYDYWGQGLTVTVSSHHHHHH *
261	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRH79B	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFGS YTTGWFRQAPGKEREVAAALSWIGSSTYYPDSV KGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCA AGPGITPNPRTRTYDYWGQGLTVTVSSHHHHHH *
262	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	2TRH81	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTIGS YTTGWFRQAPGKEREVAAALSWIGSSTYYPDSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AGPGITPNPRTRTYDYWGQGLTVTVSSHHHHHH *

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
263	proteína de fusión anti-CD3/anti-TROP2	3TRH53	SGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASST GAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLVPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAI NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFSS YAMGWFRQAPGKERE FVAAITRSGGSTLYADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA ASGTGWPLEY EY EYDYWGQGLTVTVSSHHHHH H*
264	proteína de fusión anti-ALB/anti-CD3/anti-TROP2 escindible	2TRH79B	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSKFG MSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGR DTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGLTVTVSSGGGGPQAST GRSGGGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCAS STGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLV PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCT LWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKY AINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD QVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHANFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLT LSCAASGRTF GSYTTGWFRQAPGKERE FVAALSWIGSSTYYPS VKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYC AAGPGITPNPRTRTYDYWGQGLTVTVSSHHHHH H*
265	marco 1	2TRL2	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLS CAAS
266	marco 1	2TRL4	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
267	marco 1	2TRL11	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
268	marco 1	2TRL12	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
269	marco 1	2TRL20	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
270	marco 1	2TRL22	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAVS
271	marco 1	2TRL29	QVQLQESGGGVVQAGGSLRLS CAAS
272	marco 1	2TRL31	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
273	marco 1	2TRL33	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
274	marco 1	2TRL37	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAAS
275	marco 1	2TRL50	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAAS
276	marco 1	2TRL55	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
277	marco 1	2TRL61	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CAAS
278	marco 1	2TRL70	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLS CAAS
279	marco 1	2TRL74	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLS CTAS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
280	marco 1	2TRL76	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
281	marco 1	2TRL78	QVQLQESGGGLAQPGGSLRLSCVAS
282	marco 1	2TRL84	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAAS
283	marco 1	2TRL89	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
284	marco 1	2TRL92	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
285	marco 1	3TRL3	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
286	marco 1	3TRL9	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLTCAAS
287	marco 1	3TRL10	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAAS
288	marco 1	3TRL16	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAAS
289	marco 1	3TRL24	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
290	marco 1	3TRL25	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAAS
291	marco 1	3TRL29	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
292	marco 1	3TRL56	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSCAAS
293	marco 1	3TRL58	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCALS
294	marco 1	3TRL68	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
295	marco 1	3TRL73	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
296	marco 1	3TRL77	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
297	marco 1	3TRL78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
298	marco 1	3TRL87	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
299	marco 1	2TRL1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
300	marco 1	2TRL5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
301	marco 1	2TRL8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
302	marco 1	2TRL10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
303	marco 1	2TRL27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
304	marco 1	2TRL46	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
305	marco 1	2TRL69	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
306	marco 1	2TRL94	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
307	marco 1	2TRL79	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
308	marco 1	2TRL81	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
309	marco 1	2TRL18	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCEVS
310	marco 1	3TRL27	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCVVS
311	marco 1	2TRL28	QVQLQESGGGLAQAGDSLRLSCAAS
312	marco 1	2TRL39	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
313	marco 1	3TRL82	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
314	marco 1	2TRL68	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
315	marco 1	2TRL64	QVQLQESGGGLVQPGDSLRLSCVAS
316	marco 1	3TRL53	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
317	marco 1	2TRH76	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS
318	marco 1	2TRH79	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS
319	marco 1	2TRH79B	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS
320	marco 1	2TRH81	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS
321	marco 1	3TRH53	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS
322	marco 2	2TRL2	VMGWFRQAPGKEREVAGI
323	marco 2	2TRL4	VMGWFRQAPGKEREVAGV

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
324	marco 2	2TRL11	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
325	marco 2	2TRL12	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
326	marco 2	2TRL20	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
327	marco 2	2TRL22	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
328	marco 2	2TRL29	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
329	marco 2	2TRL31	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
330	marco 2	2TRL33	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
331	marco 2	2TRL37	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
332	marco 2	2TRL50	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
333	marco 2	2TRL55	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
334	marco 2	2TRL61	VMGWFRQAPGKEREFVAGA
335	marco 2	2TRL70	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
336	marco 2	2TRL74	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
337	marco 2	2TRL76	VMGWFRQYPGKEREFVAGI
338	marco 2	2TRL78	VMGWFRQAPGKEREFVAGV
339	marco 2	2TRL84	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
340	marco 2	2TRL89	VMGWLRLQAPGKEREFVAGI
341	marco 2	2TRL92	VVGWFRQAPGKEREFVAGI
342	marco 2	3TRL3	VMGWFRQAPGKEREFVGGI
343	marco 2	3TRL9	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
344	marco 2	3TRL10	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
345	marco 2	3TRL16	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
346	marco 2	3TRL24	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
347	marco 2	3TRL25	VMGWFRQAPGKEREFVAGV
348	marco 2	3TRL29	VMGWFRQAPGKEREFVAGV
349	marco 2	3TRL56	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
350	marco 2	3TRL58	VMGWFRQAPGKEREFVAGV
351	marco 2	3TRL68	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
352	marco 2	3TRL73	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
353	marco 2	3TRL77	VVGWFRQAPGKEREFVAGI
354	marco 2	3TRL78	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
355	marco 2	3TRL87	VMGWFRQAPGKEREFVAGI
356	marco 2	2TRL1	AMAWYRQAPGNQRELVASI
357	marco 2	2TRL5	AMAWYRQAPGNQRELVASI
358	marco 2	2TRL8	AMAWYRQAPGNQRELVASI
359	marco 2	2TRL10	AMAWYRQAPGNQRELVASI
360	marco 2	2TRL27	AMAWYRQAPGNQRELVASI
361	marco 2	2TRL46	AMAWYRQAPGNQRELVASI
362	marco 2	2TRL69	AMAWYRQAPGNQRELVASI
363	marco 2	2TRL94	AMAWYRQAPGNQRELVASI
364	marco 2	2TRL79	TTGWFRQAPGKEREFVAAL
365	marco 2	2TRL81	TTGWFRQAPGKEREFVAAL
366	marco 2	2TRL18	GMGWVRQAPGKERELIAGI
367	marco 2	3TRL27	AMGWVRQAPGKEREFVVAI

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
368	marco 2	2TRL28	AMGWFRQAPGKEREVAAI
369	marco 2	2TRL39	AMGWFRQAPGKEREVATI
370	marco 2	3TRL82	AMGWYRQGPQKQKQDLVAVT
371	marco 2	2TRL68	DMAWFRQAPGKEREVIAAI
372	marco 2	2TRL64	MGWFRQAPGKEREVAAI
373	marco 2	3TRL53	AMGWFRQAPGKEREVAAI
374	marco 2	2TRH76	VMGWFRQYPGKEREVAGI
375	marco 2	2TRH79	TTGWFRQAPGKEREVAAAL
376	marco 2	2TRH79B	TTGWFRQAPGKEREVAAAL
377	marco 2	2TRH81	TTGWFRQAPGKEREVAAAL
378	marco 2	3TRH53	AMGWFRQAPGKEREVAAI
379	marco 3	2TRL2	TYVVDVSKGRFAISTDDAKNTVYLMNLSKPED TAVYYCAA
380	marco 3	2TRL4	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMDSLKPED TAVYYCAA
381	marco 3	2TRL11	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
382	marco 3	2TRL12	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
383	marco 3	2TRL20	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
384	marco 3	2TRL22	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
385	marco 3	2TRL29	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
386	marco 3	2TRL31	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
387	marco 3	2TRL33	TYVADSVKGRFTISTDNANTVYLMNRLKPEDT AVYYCAA
388	marco 3	2TRL37	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
389	marco 3	2TRL50	TYVVDVSKGRFAISTDDAKNTVYLMNLSKPED TAVYYCAA
390	marco 3	2TRL55	TNYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED AAVYYCAA
391	marco 3	2TRL61	TYVADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMDSLKPED TAVYYCAA
392	marco 3	2TRL70	TYVTDSVKGRFTFSRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
393	marco 3	2TRL74	TNYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMNSLKPED AAVYYCAA
394	marco 3	2TRL76	TYVADSVKGRFTISTDNAKTISTDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
395	marco 3	2TRL78	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQDSLKPED TAVYYCAA
396	marco 3	2TRL84	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYYCAA
397	marco 3	2TRL89	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYYCAA
398	marco 3	2TRL92	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
399	marco 3	3TRL3	TSYAESVKGRFTISTDNAKDTVYLMQNSLKPEDT AVYYCAA
400	marco 3	3TRL9	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
401	marco 3	3TRL10	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
402	marco 3	3TRL16	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYYCAA
403	marco 3	3TRL24	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYSCAA
404	marco 3	3TRL25	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQDSLKPED TAVYYCAA
405	marco 3	3TRL29	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQDSLKPED TAVYYCAA
406	marco 3	3TRL56	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
407	marco 3	3TRL58	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQDSLKPED TAVYYCAA
408	marco 3	3TRL68	AYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYYCAA
409	marco 3	3TRL73	TYYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED TAVYYCAA
410	marco 3	3TRL77	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
411	marco 3	3TRL78	TYYVDSVKGRFAISTDDAKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCAA
412	marco 3	3TRL87	TNYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLMQNSLKPED AAVYYCAA
413	marco 3	2TRL1	TNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQNNLKPED TAVYYCNV
414	marco 3	2TRL5	ANYAESVNGRFTISRDNKNTVYLMQNNLKPED TADYYCNV
415	marco 3	2TRL8	TNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQNNLKPED TAVYSCNV
416	marco 3	2TRL10	TNYAESVKGRFTISRDNKNTAYLMQNNLKPED TAVYYCNV

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
417	marco 3	2TRL27	TNYVESVKGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPED TAVYYCNV
418	marco 3	2TRL46	SNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPED TAGYYCNV
419	marco 3	2TRL69	TNYVESVRGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPED TAVYYCNV
420	marco 3	2TRL94	TNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPED TAVYYCNV
421	marco 3	2TRL79	TYYPDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
422	marco 3	2TRL81	TYYPDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
423	marco 3	2TRL18	VYYADSVKGRFTISRDNKNTVFLQMNSLKPAD TSVYYCGA
424	marco 3	3TRL27	VYYADSVKGRFTISRDNKNTVFLQMNSLKPAD TSVYYCGA
425	marco 3	2TRL28	TYYADSVKGRFTISTDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
426	marco 3	2TRL39	TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
427	marco 3	3TRL82	TSYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCNL
428	marco 3	2TRL68	TDYVDFVKGRFTSSRDNAKNTVYLMNSLKPED TALYFCAA
429	marco 3	2TRL64	AYYADSVKGRFFISRDNKNTVYLMNNLKPED DTAVYSCAA
430	marco 3	3TRL53	TLYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPED TAVYYCAA
431	marco 3	2TRH76	TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRAED TAVYYCAA
432	marco 3	2TRH79	TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRAEDT AVYYCAA
433	marco 3	2TRH79B	TYYPDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAED TAVYYCAA
434	marco 3	2TRH81	TYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRAEDT AVYYCAA
435	marco 3	3TRH53	TLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRAEDT AVYYCAA
436	marco 4	2TRL2	WGQGTQVTVSS
437	marco 4	2TRL4	WGQGTQVTVSS
438	marco 4	2TRL11	WGQGTQVTVSS
439	marco 4	2TRL12	WGQGTQVTVSS
440	marco 4	2TRL20	WGQGTQVTVSS
441	marco 4	2TRL22	WGQGTQVTVSS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
442	marco 4	2TRL29	WGQGTQVTVSS
443	marco 4	2TRL31	WGQGTQVTVSS
444	marco 4	2TRL33	WGQGTQVTVSS
445	marco 4	2TRL37	WGQGTQVTVSS
446	marco 4	2TRL50	WGQGTQVTVSS
447	marco 4	2TRL55	WGQGTQVTVSS
448	marco 4	2TRL61	WGQGTQVTVSS
449	marco 4	2TRL70	WGQGTQVTVSS
450	marco 4	2TRL74	WGQGTQVTVSS
451	marco 4	2TRL76	WGQGTQVTVSS
452	marco 4	2TRL78	WGQGTQVTVSS
453	marco 4	2TRL84	WGQGTQVTVSS
454	marco 4	2TRL89	WGQGTQVTVSS
455	marco 4	2TRL92	WGQGTQVTVSS
456	marco 4	3TRL3	WGQGTQVTVSS
457	marco 4	3TRL9	WGQGTQVTVSS
458	marco 4	3TRL10	WGQGTQVTVSS
459	marco 4	3TRL16	WGQGTQVTVSS
460	marco 4	3TRL24	WGQGTQVTVSS
461	marco 4	3TRL25	XGQGTQVTVSS
462	marco 4	3TRL29	WGQGTQVTVSS
463	marco 4	3TRL56	WGQGTQVTVSS
464	marco 4	3TRL58	WGQGTQVTVSS
465	marco 4	3TRL68	WGQGTQVTVSS
466	marco 4	3TRL73	WGQGTQVTVSS
467	marco 4	3TRL77	WGQGTQVTVSS
468	marco 4	3TRL78	WGQGTQVTVSS
469	marco 4	3TRL87	WGQGTQVTVSS
470	marco 4	2TRL1	WGQGTQVTVSS
471	marco 4	2TRL5	WGQGTQVTVSS
472	marco 4	2TRL8	WGQGTQVTVSS
473	marco 4	2TRL10	WGQGTQVTVSS
474	marco 4	2TRL27	WGQGTQVTVSS
475	marco 4	2TRL46	WGQGTQVTVSS
476	marco 4	2TRL69	WGQGTQVTVSS
477	marco 4	2TRL94	WGQGTQVTVSS
478	marco 4	2TRL79	WGQGTQVTVSS
479	marco 4	2TRL81	WGQGTQVTVSS
480	marco 4	2TRL18	WGQGTQVTVSS
481	marco 4	3TRL27	WGQGTQVTVSS
482	marco 4	2TRL28	WGQGTQVTVSS
483	marco 4	2TRL39	WGQGTQVTVSS
484	marco 4	3TRL82	WGQGTQVTVSS
485	marco 4	2TRL68	WGQGTQVTVSS

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
486	marco 4	2TRL64	WGQGTQVTVSS
487	marco 4	3TRL53	WGQGTQVTVSS
488	marco 4	2TRH76	WGQGTTLVTVSS
489	marco 4	2TRH79	WGQGTTLVTVSS
490	marco 4	2TRH79B	WGQGTTLVTVSS
491	marco 4	2TRH81	WGQGTTLVTVSS
492	marco 4	3TRH53	WGQGTTLVTVSS
493	sdAb	antialbúmina	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
494	scFv	Anti-CD3	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLVPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCTLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAINWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADQVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHANFGNSYISYWAYWGQGTTLVTVSS
495	trozo	L040 trozo	SGGGGGGGS
496	etiqueta	HHHHHH	HHHHHH
497	enlazador	G4SG3S	GGGSGGGS
498	enlazador escindible	L040 secuencia de enlazador completa v2	GGGGPQASTGRSGGGGGGS
499		enlazador escindible por proteasa 4	GGGGPLGLQAGVVGGGGT
500		enlazador escindible por proteasa 5	GGGGPLNLQAGVVGGGGT
501		enlazador escindible por proteasa 6	GGGGPAGLQAGVVGGGGT
502		enlazador escindible por proteasa 7	GGGGPANLQAGVVGGGGT
503		enlazador escindible por proteasa	GGGGEYSGLSDGGGGGT

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
		8	
504		enlazador escindible por proteasa 9	GGGGKPAEFTVDGGGGT
505		enlazador escindible por proteasa 11	GGGGGDFLAEGGGGT
506		enlazador escindible por proteasa 12	GGGGAGPLIVGGGGT
507		enlazador escindible por proteasa 13	GGGGLRELHLGGGGT
508		L276	PQASTGGSGG
509		enlazador escindible por proteasa 77	GGGGLRELHLGGGGT
510		L276 secuencia completa v1	GGGGPQASTGGSGGGGGGT
511		L276 secuencia completa v2	GGGGPQASTGGSGGGGGGS
512		L077 secuencia completa v1	GGGGLRELHLGGGGS
513		L077 secuencia completa v2	GGGGLRELHLGGGGT
514		Enlazador	(GS)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
515		Enlazador	(GSS)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
516		Enlazador	(GGGS)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
517		Enlazador	(GGSG)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
518		Enlazador	(GGSGG)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
519		Enlazador	(GGGGS)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
520		Enlazador	(GGGGG)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
521		Enlazador	(GGG)n en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10
522		Enlazador	(GGGGSGGGSGGGGSGGGGS)
523		Enlazador	(GGGGSGGGSGGGGS)
524		Enlazador	(GSGGS)n

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
525		Enlazador	GGSG
526		Enlazador	GGSGG
527		Enlazador	GSGSG
528		Enlazador	GSGGG
529		Enlazador	GGGSG
530		Enlazador	GSSSG
531		Enlazador	(g ₄ S) _n , en donde n=1 a 4
532		Enlazador	(G ₄ S) _n , en donde n=2 a 4
533		Enlazador	(G ₄ S) _n , en donde n=1 a 3
534	Secuencia de enlazador escindible ilustrativa		KPLGLQARVV
535	Secuencia de enlazador escindible ilustrativa		PQASTGRSGG
536	Secuencia de enlazador escindible ilustrativa		PQGSTGRAAG
537	Secuencia de enlazador escindible ilustrativa		PPASSGRAGG
538	Secuencia de enlazador escindible ilustrativa		PIPVQGRAH
539	Secuencia de enlazador ilustrativa	L040	GGGGPQASTGRSGGGGGG
540	Secuencia de enlazador ilustrativa	L041	GGGGPQGSTGRAAGGGGG
541	Secuencia de enlazador ilustrativa	L043	GGGGPQGSTARSAAGGGGG
542	Secuencia de enlazador ilustrativa	L001	GGGGKPLGLQARVVGGGG
543	Secuencia de enlazador ilustrativa		GGGGT
544	Enlazador	NCLV	GGGSGGGGSGGVVGGGG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
545	enlazador no escindible	NCLV	GGGSGGGGSGGVVGGGGT
546	Proteína TROP2 humana de tipo natural		MARGPGLAPPPLRLPLLLLVLAAVTGHTAAQDN CTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRA LGSGMAVD CSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVD NDGLYDPDCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSV GVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAG AFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFVA AVHYEQ PTIQIELRQNTSQKAAGDVDIGDAAYYFERDIKG ESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLIYYLDEIPPK FSMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGMAVLVITNR RKSGKYKKVEIKELGELRKEPS
547	Proteína TROP2 madura		HTAAQDNCTCPTNKMTVCSPDGPGGRCQCRA L GSGMAVDCSTLTSKCLLLKARMSAPKNARTLVR PSEHALVDNDGLYDPDCDPEGRFKARQCNQTSV CWCVNSVGVRRTDKGDLSLRCDELVRTHHILID LRHRPTAGAFNHSDLDAELRRLFRERYRLHPKFV AAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAAGDVDIGDAAY YFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEPLQVERTLI YYLDEIPPKFSMKRLTAGLIAVIVVVVVALVAGM AVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKEPSL
548		secuencia de reconocimiento de sortasa	LPETG
549		Anti-albúmina con máscara de bucle sin CDR	EVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSKFG MSWVRQGGGGGLDGNEEPGGLEWVSSISGSGR DTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS
550	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGGLDGNEEPGG
551	Secuencia transmembrana		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
552	Secuencia transmembrana	CD8 beta derivado	GLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCC
553	Secuencia transmembrana	CD4 derivado	ALIVLGGVAGLLLFIGLGIFFCVRC
554	Secuencia transmembrana	CD3 zeta derivado	LCYLLDGILFIYGVILTALFLRV
555	Secuencia transmembrana	CD28 derivado	WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
556	Secuencia transmembrana	CD134 (OX40) derivado	AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLL

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
557	Secuencia transmembrana	CD7 derivado	ALPAALAVISFLLGLGLGVACVLA
558	Resto de enmascaramiento ilustrativo		APGKG
559	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGQDGNEEMGGG
560	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGQDGNEEGG
561	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGQDGNEEMGGGGG
562	Resto de enmascaramiento ilustrativo		APFGSEM
563	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AWNGPYE
564	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AQDNGDTKTG
565	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AEAKETQG
566	Resto de enmascaramiento ilustrativo		ATRREQVEG
567	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AQAPSQP
568	Resto de enmascaramiento ilustrativo		ATRSRTRNDG
569	Resto de enmascaramiento ilustrativo		ADVDAPDGLG
570	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AADISDPGG
571	Resto de enmascaramiento ilustrativo		ALSVDPSG
572	Resto de enmascaramiento		ARLSVDPG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
	ilustrativo		
573	Resto de enmascaramiento ilustrativo		AVEAADRG
574	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGPDGNEEMGGG
575	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGFDGNEEMGGG
576	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGgDGNEEMGGG
577	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGEMDGEGQNGG
578	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGGPDGNEEPGG
579	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGSLDGNEEPGG
580	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGALDGNEEPGG
581	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGALDGNEEPGG
582	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGGPDGNEEPGGG
583	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGSGALDGNEEPGG
584	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGSGSLDGNEEPGG
585	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGSGGPDGNEEPGG
586	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGVRDGPDGNEEPGG
587	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGSGGPDGNEEPGGGG

SEQ ID NO.	Descriptor de secuencia	Nombre de sec.	Secuencia de aminoácidos
588	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGRGPDGNEEPGG
589	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGSGGLDGNEEPGG
590	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGVGPDGNEEPGG
591	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGEGPDGNEEPGG
592	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGVALDGNEEPGG
593	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGRALDGNEEPGG
594	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGYAGLDGNEEPGG
595	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGAGGPDGNEEPGG
596	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGRGGPDGNEEPGG
597	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGGPDGNEEPGGGG
598	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGGEALDGNEEPGG
599	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGDASLDGNEEPGG
560	Resto de enmascaramiento ilustrativo		GGRDAPDGNEEGG

[00289] Aunque se han mostrado y descrito en el presente documento realizaciones preferidas de la presente divulgación, resultará obvio para los expertos en la técnica que dichas realizaciones se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la materia sin apartarse de la divulgación. Debe entenderse que se pueden emplear varias alternativas a las realizaciones de la divulgación descritos en el presente

documento para llevar a la práctica la divulgación. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la divulgación y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos de ese modo.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un dominio de unión a TROP2 que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.
2. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 1, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.
3. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.
4. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio de unión a TROP2 es parte de una proteína multiespecífica.
5. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 4, en donde la proteína multiespecífica comprende además un dominio de unión a CD3.
6. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 5, en donde la proteína multiespecífica comprende un formato de fármaco activo.
7. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde la proteína multiespecífica comprende además un dominio de unión a proteína de suero en masa.

8. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 7, en donde la proteína de suero en masa comprende una proteína de seroalbúmina.

9. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 8, en donde la proteína de seroalbúmina comprende una proteína de seroalbúmina humana.

10. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el dominio de unión a proteínas séricas en masa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493 o 549.

11. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

12. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en donde la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 229-264.

13. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el dominio de unión a proteínas séricas en masa es un resto de unión que comprende un enlazador y un resto de enmascaramiento, en donde el resto de enmascaramiento enmascara la unión del dominio de unión a TROP2 o el dominio de unión a CD3, a sus respectivas dianas.

14. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y 13, en donde la proteína multiespecífica comprende un formato de profármaco no escindible.

15. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 13 o 14, en donde el resto de enmascaramiento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560.

16. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el enlazador comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-545 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-545.

17. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde el dominio de unión a proteínas séricas en masa comprende una secuencia que es al menos

un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493 o 549.

18. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9 y 13-17, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 494.

19. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y 13-18, en donde la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

20. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y 13-19, en donde la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

21. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9 y 13-20, en donde la proteína multiespecífica comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

22. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 6, en donde el fármaco activo comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

23. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio de unión a TROP2 es parte de un receptor de antígeno quimérico (un CAR) o un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activable (un ProCAR), en donde el CAR comprende además al menos uno de un dominio transmembrana, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular.

24. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 23, en donde el dominio de unión a TROP2 es parte del ProCAR y el ProCAR comprende además (a) un resto de unión que comprende un bucle no de CDR y un enlazador escindible; (b) un dominio transmembrana; y (c) un dominio de señalización intracelular; en donde el resto de unión enmascara la unión del dominio de unión a TROP2 a su diana.

25. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 24, en donde el resto de unión comprende además una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR).

26. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 25, en donde el bucle no de CDR

proporciona un sitio de unión específico para una proteína de suero en masa.

27. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 26, en donde la proteína de suero en masa comprende al menos uno de: una albúmina sérica, una transferrina, una IgG1, una IgG2, una IgG4, una IgG3, un monómero de IgA, un factor XIII, un fibrinógeno o una IgM pentamérica.

28. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 27, en donde la proteína de suero en masa comprende la seroalbúmina.

29. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 28, en donde la seroalbúmina es una seroalbúmina humana.

30. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 23-29, en donde el ProCAR comprende además un dominio coestimulador, en donde el dominio coestimulador es un dominio de señalización funcional de una proteína seleccionada del grupo que consiste en OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) y 4-1BB (CD137), y secuencias de aminoácidos de las mismas que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones a los mismos.

31. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 30, en donde la al menos una, pero no más de 20, modificaciones del mismo comprenden una modificación de un aminoácido que media la señalización celular o una modificación de un aminoácido que se fosforila en respuesta a un ligando que se une a la proteína de fusión del receptor de linfocitos T codificada.

32. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 23-31, en donde el CAR o el ProCAR comprende además el dominio transmembrana y el dominio transmembrana es una proteína seleccionada del grupo que consiste en una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, una cadena zeta de TCR, una subunidad de TCR CD3 épsilon, una subunidad de TCR CD3 gamma, una subunidad de TCR CD3 delta, CD45, CD4, CDS, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD28, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, fragmentos funcionales de las mismas y secuencias de aminoácidos de las mismas que tienen al menos una pero no más de 20 modificaciones de los mismos.

33. El dominio de unión a TROP2 de cualquiera de las reivindicaciones 23-32, en donde el CAR o el ProCAR comprende además el dominio de señalización intracelular y el dominio de señalización intracelular se deriva de un CD3 épsilon, un CD3 gamma, un CD3 delta, un CD3 alfa, un CD3 beta, o una combinación de los mismos.

34. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 33, en donde el dominio de señalización intracelular se deriva de CD3 épsilon.

35. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral, que comprende administrar un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, o una composición farmacéutica que comprende el mismo, a un sujeto que lo necesita.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el sujeto es humano.

37. Una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa que comprende un resto de unión (M) que comprende un bucle no de CDR, un enlazador escindible (L), un primer dominio de unión a antígeno diana (T1) y un segundo dominio de unión a antígeno diana (T2), en donde al menos uno del primer dominio de unión a antígeno diana (T1) y el segundo dominio de unión a antígeno diana (T2) comprende un dominio de unión a TROP2, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; comprendiendo la CDR2 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y comprendiendo la CDR3 una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228, en donde el bucle no de CDR es capaz de unirse al dominio de unión a TROP2 o al segundo dominio de unión a antígeno diana, y en donde el resto de unión es capaz de enmascarar, o enmascara, la unión del dominio de unión a TROP2 o el segundo dominio de unión a antígeno diana a su diana.

38. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de la reivindicación 37, en donde el resto de unión comprende un resto de enmascaramiento y en donde el resto de enmascaramiento comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560, o una secuencia que comprende una o más sustituciones con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 550 y 558-560.

39. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de la reivindicación 37 o 38, en donde el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones con respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

40. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-39, en donde el resto de unión comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

41. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-40, en donde el segundo dominio de unión a antígeno diana (T2) comprende un dominio de unión a CD3.

42. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de la reivindicación 41, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

43. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37-42, o una composición farmacéutica que comprende la misma, al sujeto.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el sujeto es humano.

45. Un método para proporcionar inmunidad antitumoral a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37-42, o una composición farmacéutica que comprende la misma, al sujeto.

46. El método de la reivindicación 45, en donde el sujeto es humano.

47. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34, en donde el dominio de unión es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

48. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-34 y 47, en donde el dominio de unión es un anticuerpo de dominio único, un dominio VHH, un scFv, un dominio VH, un dominio VL, un Fab, un F(ab')₂, un Fab', un dominio no de Ig, un ligando, una knotina o una entidad de molécula pequeña.

49. El dominio de unión a TROP2 de la reivindicación 48, en donde el dominio de unión comprende el anticuerpo de dominio único.

50. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 47-49, en donde el dominio de unión se une a TROP2 con una afinidad de unión (K_D) de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 500 nM.

51. El dominio de unión a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 47-50, en donde el dominio de unión se une a TROP2 humana, TROP2 de ratón, TROP2 de macaco cangrejero, o una combinación de los mismos.

52. Una proteína multiespecífica que comprende un dominio de unión a TROP2, en donde el dominio de unión a TROP2 es de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 47-51.

53. La proteína multiespecífica de la reivindicación 52, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende además un dominio de unión a CD3 (dominio anti-CD3).

54. La proteína multiespecífica de la reivindicación 53, en donde el dominio anti-TROP2 y el dominio anti-CD3 están en una orientación anti-TROP2:anti-CD3.

55. La proteína multiespecífica de la reivindicación 53, en donde el dominio anti-TROP2 y el dominio anti-CD3 están en una orientación anti-CD3:anti-TROP2.

56. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 52-55, que comprende el dominio de unión a TROP2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 47-51 (dominio anti-TROP2), el dominio de unión a CD3 (dominio anti-CD3) y un dominio de unión a albúmina (dominio anti-ALB).

57. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 52-56, en donde el dominio anti-CD3 comprende un aminoácido como se expone en SEQ ID NO: 494.

58. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-57, en donde el dominio anti-ALB comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 493.

59. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una

orientación anti-CD3: anti-ALB: anti-TROP2.

60. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-TROP2: anti-ALB: anti-CD3.

61. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-ALB: anti-TROP2: anti-CD3.

62. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-CD3: anti-TROP2: anti-ALB.

63. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-ALB: anti-CD3: anti-TROP2.

64. La proteína multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 56-58, en donde el dominio anti-TROP2, el dominio anti-CD3 y el dominio anti-ALB están en una orientación anti-TROP2: anti-CD3: anti-ALB.

65. Una proteína multivalente que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 229-264.

66. Un fármaco activo que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 229-264.

67. Un fármaco activo que comprende una secuencia como se expone en una cualquiera de SEQ ID NO: 1-57.

68. Una composición farmacéutica que comprende: (i)(a) un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-34 y 47-51; (i)(b) una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37-42; (i)(c) una proteína multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 52-64; (i)(d) una proteína multivalente de acuerdo con la reivindicación 65; o (i)(e) un fármaco activo de acuerdo con la reivindicación 66 o 67, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

69. Un proceso para producir un dominio de unión a TROP2, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión a TROP2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 47-51, en condiciones que permiten la expresión del dominio de unión a TROP2 y recuperar y purificar la proteína producida del cultivo.

70. Un proceso para producir una proteína multiespecífica, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína de unión a TROP2 multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 52-64 en condiciones que permiten la expresión de la proteína multiespecífica y recuperar y purificar la proteína producida a partir del cultivo.

71. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar un dominio de unión a TROP2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-34 y 47-51, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 68, al sujeto.

72. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar la proteína multiespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 52-64, una proteína multivalente de acuerdo con la reivindicación 65, un fármaco activo de acuerdo con la reivindicación 66 o 67, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 68, al sujeto.

73. El método de la reivindicación 71 o 72, en donde el sujeto es humano.

74. El método de la reivindicación 73, en donde el método comprende además la administración de un agente, en donde el agente es agente bioterapéutico, una citocina, un inhibidor de PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico), un virus oncolítico, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de IDO (indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa), un inhibidor de glutaminasa GLS1, una terapia de linfocitos T-CAR (receptor de antígeno quimérico) o de linfocitos T, un agonista de TLR (receptor tipo Toll) o una vacuna contra tumor.

75. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 71-74, en donde el dominio de unión a TROP2 se une selectivamente a células tumorales que expresan TROP2.

76. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 71-75, en donde la enfermedad

tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido.

77. El método de la reivindicación 76, en donde la enfermedad de tumor sólido es metastásica.

78. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 71-77, en donde la enfermedad tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

79. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 43-46, en donde el método comprende además la administración de un agente, en donde el agente es agente bioterapéutico, una citocina, un inhibidor de PAP (fosfatasa de ácido fosfatídico), un virus oncolítico, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de IDO (indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa), un inhibidor de glutaminasa GLS1, una terapia de linfocitos T-CAR (receptor de antígeno quimérico) o de linfocitos T, un agonista de TLR (receptor tipo Toll) o una vacuna contra tumor.

80. El método de la reivindicación 79, en donde el dominio de unión a TROP2 se une selectivamente a células tumorales que expresan TROP2.

81. El método de la reivindicación 79 u 80, en donde la enfermedad tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido.

82. El método de la reivindicación 81, en donde la enfermedad de tumor sólido es metastásica.

83. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 79-82, en donde la enfermedad tumoral es al menos una de: un cáncer colorrectal, un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un

osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

84. Un proceso para producir una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37-42, en condiciones que permitan la expresión de la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa y recuperar y purificar la proteína producida del cultivo.

85. Un proceso para producir una proteína multivalente, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína multivalente de acuerdo con la reivindicación 65, en condiciones que permitan la expresión de la proteína multivalente y recuperar y purificar la proteína producida a partir del cultivo.

86. Un proceso para producir un fármaco activo, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios del fármaco activo de acuerdo con la reivindicación 66 o 67, en condiciones que permitan la expresión del fármaco activo y recuperar y purificar el fármaco producido a partir del cultivo.

87. Una célula que comprende un CAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 y 30-33.

88. Una célula que comprende un ProCAR de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23-33.

89. La célula de la reivindicación 87 u 88, en donde la célula es un linfocito T o una célula NK.

90. Un método de preparación de un CAR o un ProCAR, que comprende transfectar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 87-89, con un vector o un ARN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el CAR o el ProCAR.

91. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-42, en donde la proteína comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

92. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-42, en donde la proteína comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

93. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-42, en donde la proteína comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

94. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de una cualquiera de las reivindicaciones 37-42 y 91-93, en donde la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa tiene un mayor índice terapéutico en comparación con una proteína de unión a TROP2 que no comprende el resto de unión (M) o el enlazador escindible (L) pero, por lo demás, es idéntica a la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa.

95. La proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de la reivindicación 94, en donde la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa tiene un índice terapéutico que es al menos aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces mayor que el de una proteína de unión a TROP2 que no comprende el resto de unión (M) o el enlazador escindible (L) pero es, por lo demás, idéntica a la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa.

96. Una composición farmacéutica que comprende: (i)(a) una proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 91-95, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

97. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 96 al sujeto.

98. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar la proteína de unión a TROP2 condicionalmente activa de acuerdo con la reivindicación 94 o 95, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 96, al sujeto.

99. El método de la reivindicación 97 o 98, en donde el sujeto es humano.

100. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 97-99, en donde la enfermedad

tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

101. Un método para aumentar un índice terapéutico de un dominio de unión a TROP2, comprendiendo el método conjugar el dominio de unión a TROP2 a un resto de unión que comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR,

- en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a TROP2,

- en donde el dominio de unión a TROP2 está enmascarado para que no se una a su diana por el resto de unión, y

- en donde el dominio de unión a TROP2 se une a su diana tras la escisión del enlazador escindible.

102. El método de la reivindicación 101, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; la CDR2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y la CDR3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

103. El método de la reivindicación 101 o 102, en donde el dominio de unión a TROP2 conjugado al resto de unión es parte de una proteína multispecífica condicionalmente activa, en donde la proteína multispecífica condicionalmente activa comprende además un dominio de unión a CD3.

104. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-103, en donde el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

105. El método de la reivindicación 103 o 104, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

106. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-105, en donde el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

107. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-106, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

108. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-107, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

109. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-107, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

110. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-107, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

111. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 101-110, en donde el dominio de unión a TROP2 conjugado al resto de unión es parte de un receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo, en donde el receptor de antígeno quimérico condicionalmente activo comprende además al menos uno de: un dominio transmembrana, un dominio de señalización intracelular y un dominio coestimulador.

112. El método de la reivindicación 111, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del

grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; la CDR2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y la CDR3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

113. El método de la reivindicación 111 o 112, en donde el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

114. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 111-113, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

115. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 111-113, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

116. Un método para aumentar un índice terapéutico de una proteína de unión a TROP2 que comprende un primer dominio de unión a antígeno diana y un segundo dominio de unión a antígeno diana, en donde al menos uno del primer y el segundo dominio de unión a antígeno diana comprende un dominio de unión a TROP2, comprendiendo el método conjugar el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana a un resto de unión que comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR,

- en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana,

- en donde al menos uno del primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana está enmascarado para que no se una a su diana por el resto de unión, y

- en donde el primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana que está enmascarado, se une a su diana tras la escisión del enlazador escindible.

117. El método de la reivindicación 116, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del

grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; la CDR2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y la CDR3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

118. El método de la reivindicación 116 o 117, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a TROP2.

119. El método de la reivindicación 116 o 117, en donde al menos uno del primer o el segundo dominio de unión a antígeno diana comprende un dominio de unión a CD3.

120. El método de la reivindicación 119, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3.

121. El método de la reivindicación 120, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

122. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-121, en donde el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

123. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-122, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

124. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-123, en donde el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

125. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-124, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

126. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-124, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 %

idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

127. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 116-124, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

128. Un método para aumentar un índice terapéutico de una proteína de unión a TROP2 que comprende un dominio de unión a TROP2 y un dominio de unión a CD3, comprendiendo el método conjugar el dominio de unión a CD3 a un resto de unión que comprende un enlazador escindible y un bucle no de CDR, en donde el bucle no de CDR comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3.

129. El método de la reivindicación 128, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; la CDR2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y la CDR3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

130. El método de la reivindicación 128 o 129, en donde el dominio de unión a CD3 comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 494.

131. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-130, en donde el resto de unión comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

132. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-131, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

133. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-132, en donde el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo

que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

134. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-133, en donde el dominio de unión a TROP2 es parte de una proteína multiespecífica condicionalmente activa y la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

135. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-133, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

136. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 128-133, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

137. Una proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2, que comprende: un dominio de unión a TROP2, un dominio de unión a CD3, un dominio de unión a albúmina, en donde el dominio de unión a albúmina comprende un bucle no de CDR que comprende un sitio de unión específico para el dominio de unión a CD3 y un enlazador escindible, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1), una CDR2 y una CDR3, en donde la CDR1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 58-114; la CDR2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115-171; y la CDR3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228 o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 172-228.

138. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de la reivindicación 137, en donde el dominio de unión a albúmina comprende una secuencia que es al menos aproximadamente un 75 % idéntica a SEQ ID NO: 493.

139. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de la reivindicación 137 o 138, en donde el dominio de unión a TROP2 comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-57.

140. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-139, en donde el enlazador escindible comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543, o una secuencia que comprende una o más sustituciones en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 497-543.

141. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-140, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 75 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

142. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-140, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 85 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

143. La proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-140, en donde la proteína multiespecífica condicionalmente activa comprende una secuencia que es al menos un 95 % idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 229-264.

144. Una composición farmacéutica que comprende una proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-143.

145. La composición farmacéutica de la reivindicación 144, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

146. Un proceso para producir la proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2, comprendiendo dicho proceso cultivar un hospedador transformado o transfectado con un vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de la proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-143, en condiciones que permiten la expresión de la proteína multiespecífica condicionalmente activa dirigida a TROP2, y recuperar y purificar la proteína producida del cultivo.

147. Un método para tratar o mejorar una enfermedad proliferativa o una enfermedad tumoral en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una proteína multiespecífica

condicionalmente activa dirigida a TROP2 de una cualquiera de las reivindicaciones 137-143, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 144 o 145, al sujeto.

148. El método de la reivindicación 147, en donde la enfermedad tumoral comprende una enfermedad de tumor sólido.

149. El método de la reivindicación 148, en donde la enfermedad de tumor sólido es metastásica.

150. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 147-149, en donde la enfermedad tumoral comprende al menos uno de: un cáncer oral, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de próstata, un cáncer de hígado, un cáncer de cuello uterino, un cáncer nasofaríngeo, un cáncer de tiroides, un cáncer de pulmón no microcítico, un cáncer de pulmón microcítico, un cáncer gástrico, un cáncer de ovario, un cáncer del endometrio, un cáncer pancreático, un cáncer de vejiga, un cáncer de vesícula biliar, un cáncer de esófago, un cáncer de mama, un adenocarcinoma, un linfoma nasal de linfocitos NK/T, un glioma, un glioblastoma, un osteosarcoma, un adenoma pituitario o cualquier combinación de los mismos.

PROTEÍNA TRIESPECÍFICA DIRIGIDA A TROP2 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

En el presente documento se proporcionan proteínas de unión a TROP2, composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas o fragmentos de las mismas, así como ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras para preparar tales proteínas de unión a TROP2. También se divulgan métodos para usar las proteínas de unión a TROP2 divulgadas en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos.

1/18

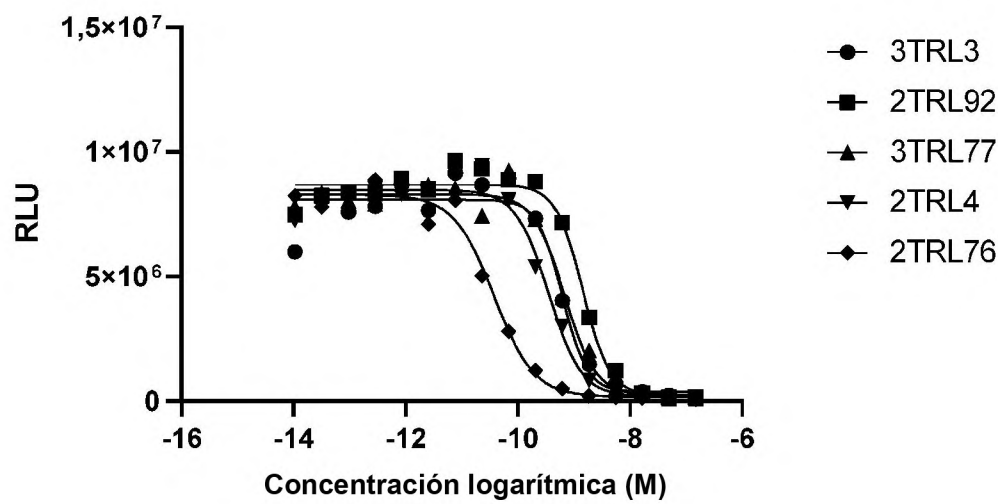


FIG. 1

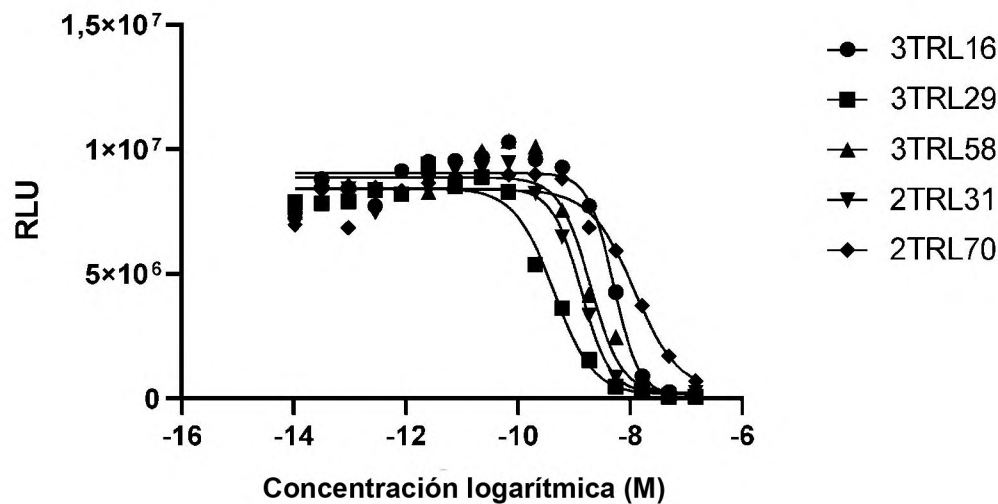


FIG. 2

2/18

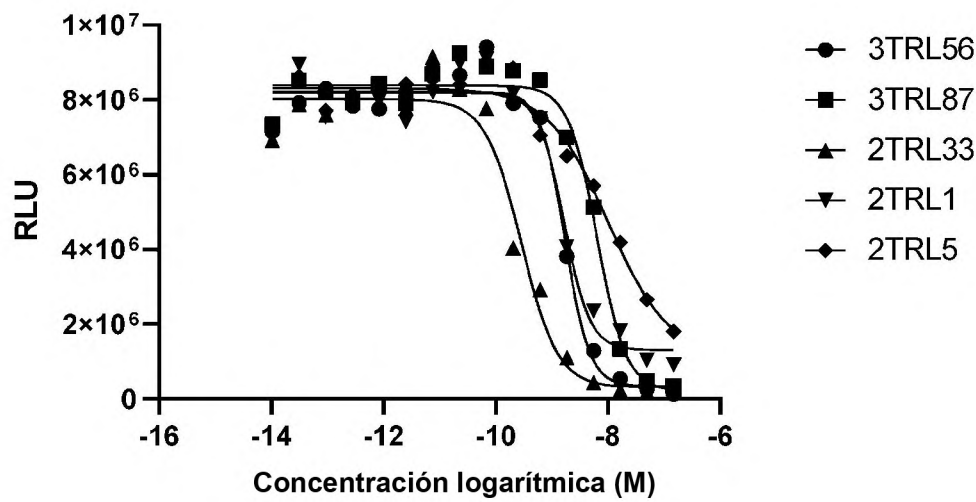


FIG. 3

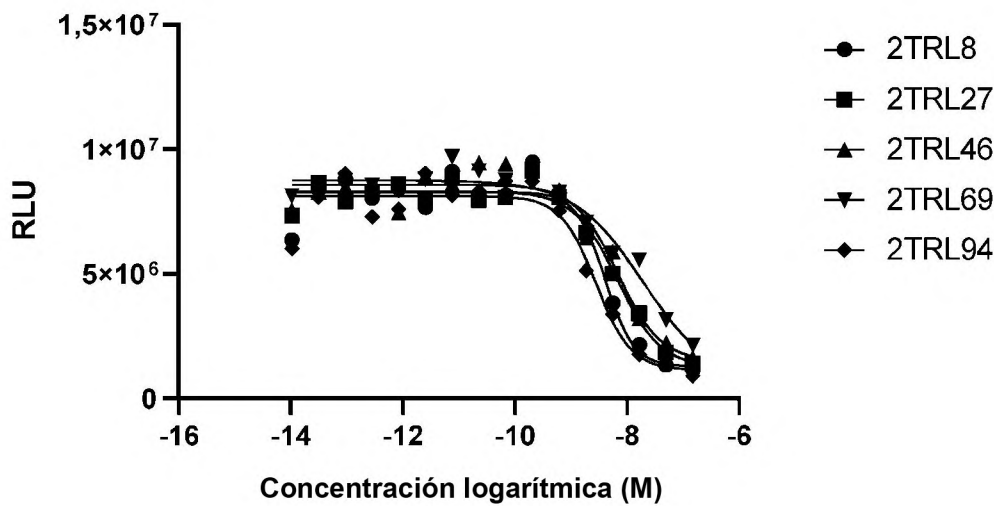


FIG. 4

3/18

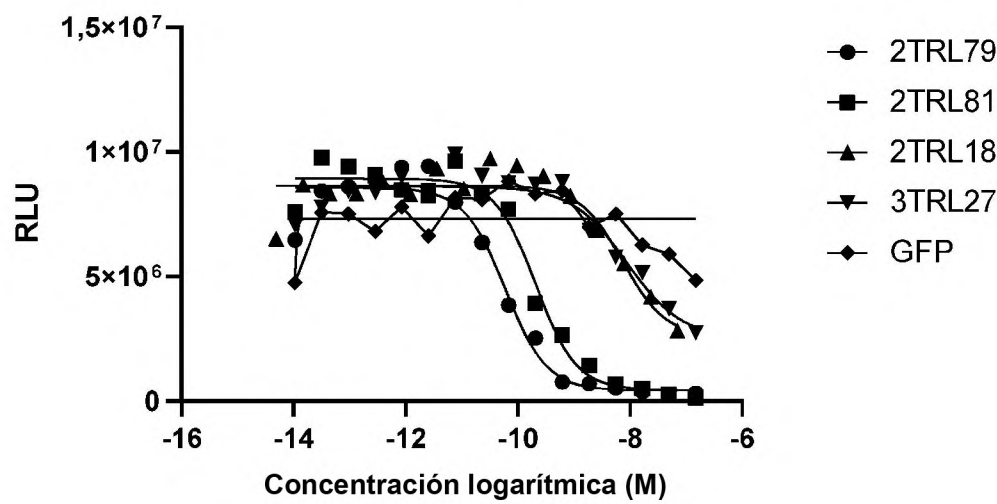


FIG. 5

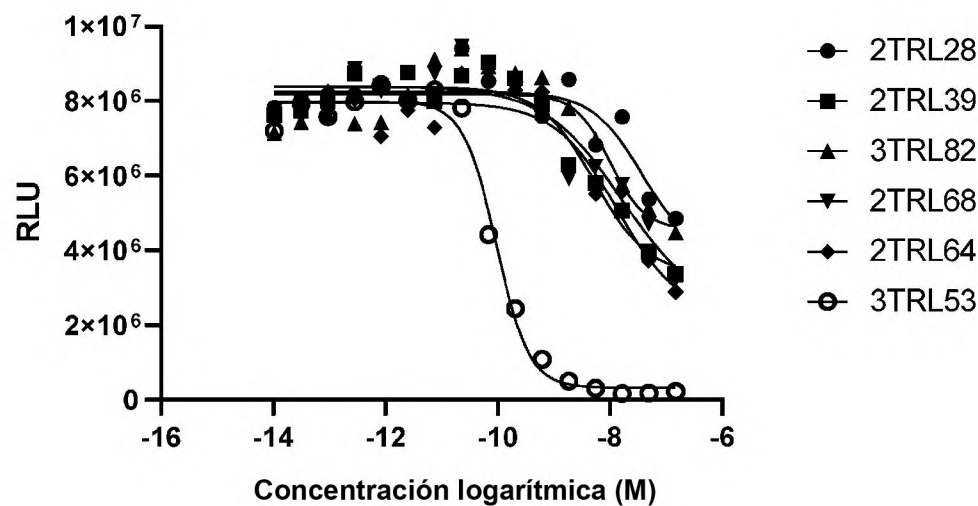


FIG. 6

4/18

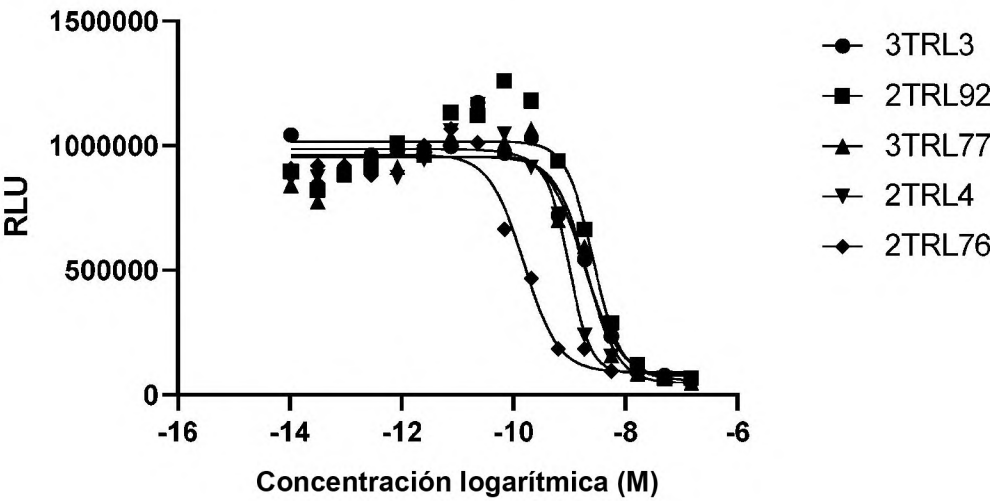


FIG. 7

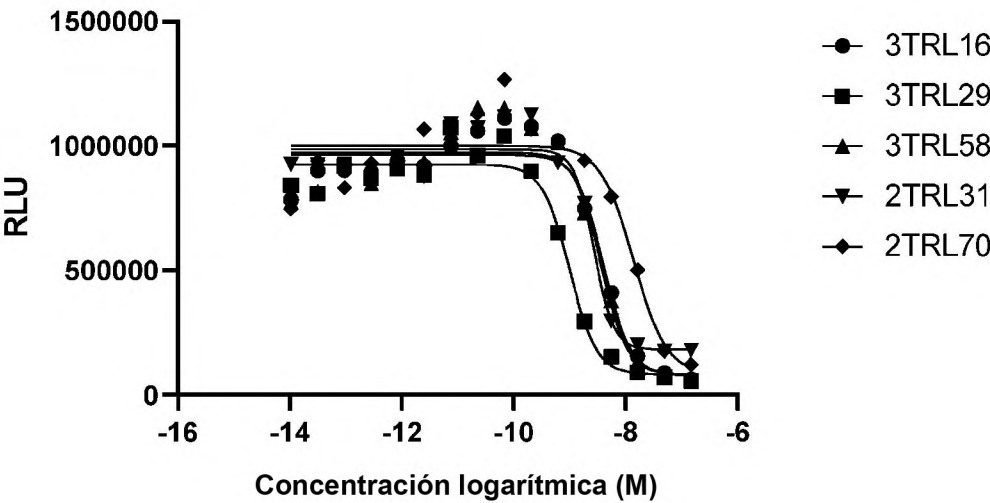


FIG. 8

5/18

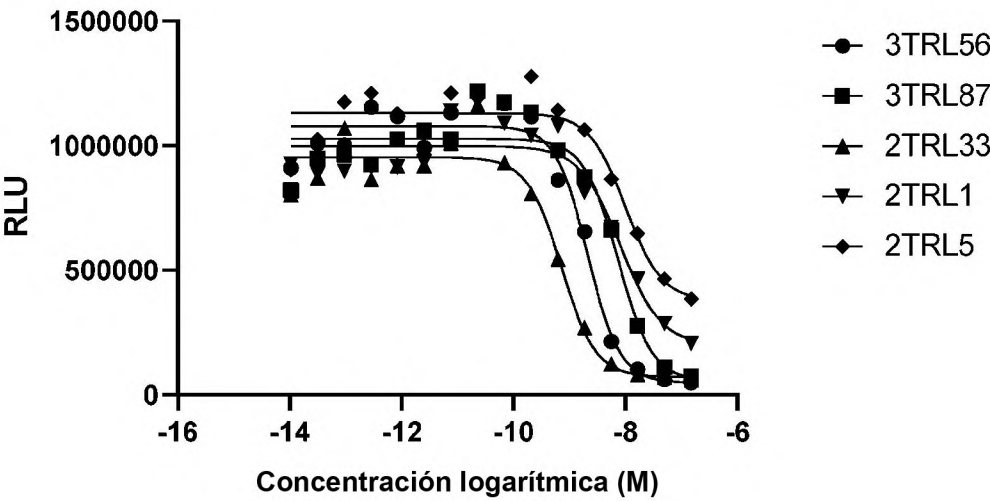


FIG. 9

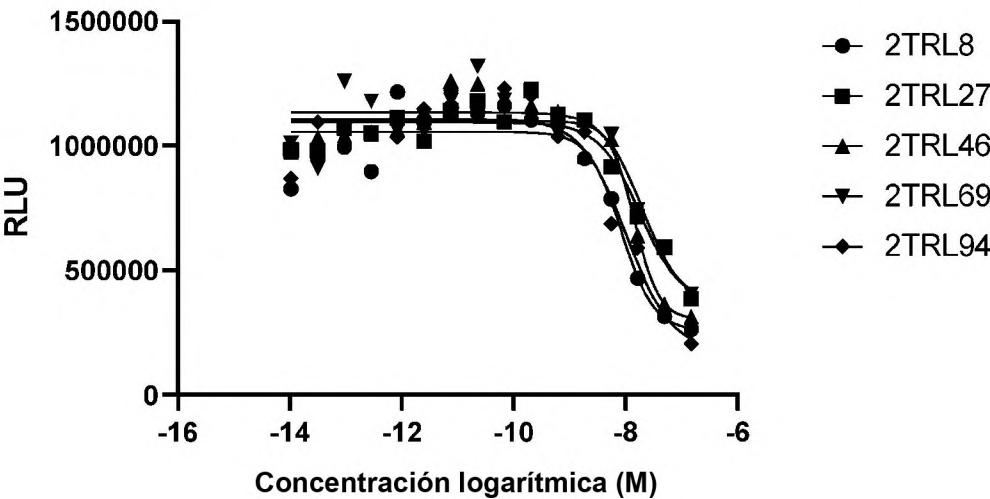


FIG. 10

6/18

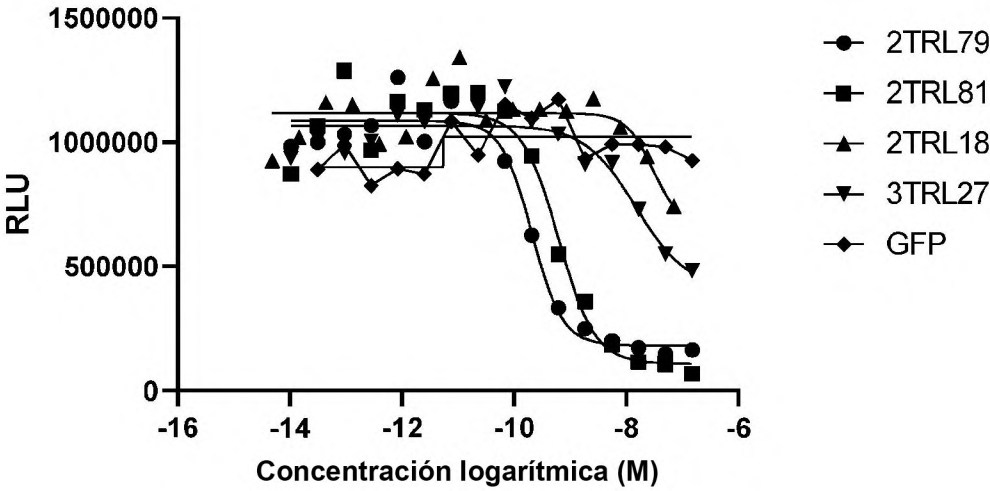


FIG. 11

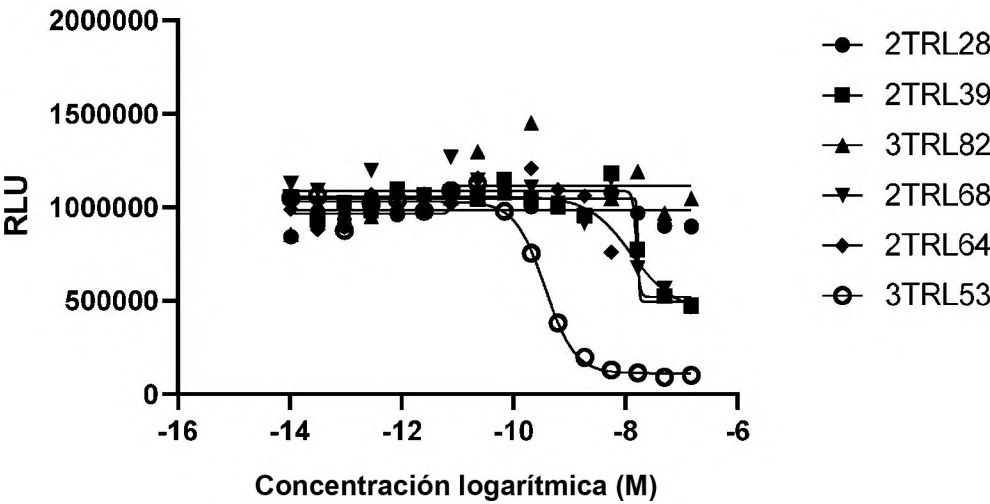


FIG. 12

7/18

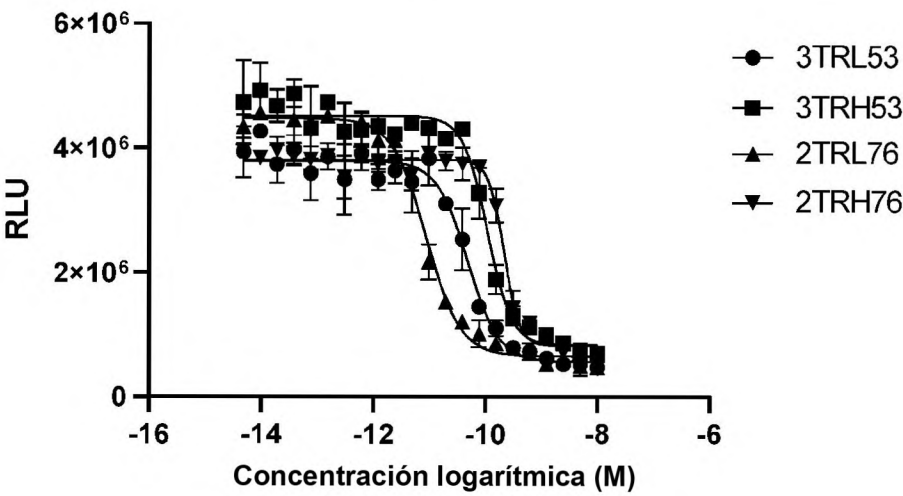


FIG. 13

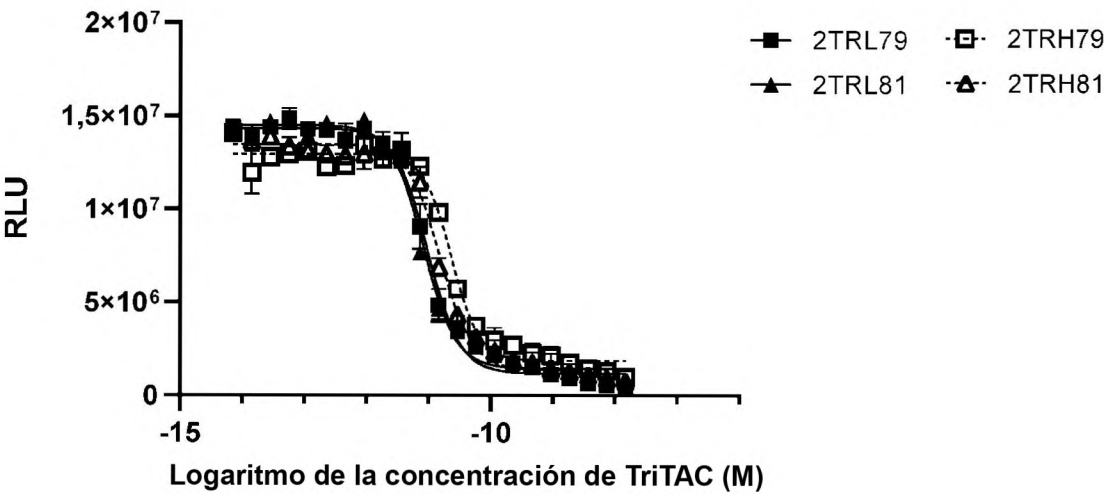


FIG. 14

8/18

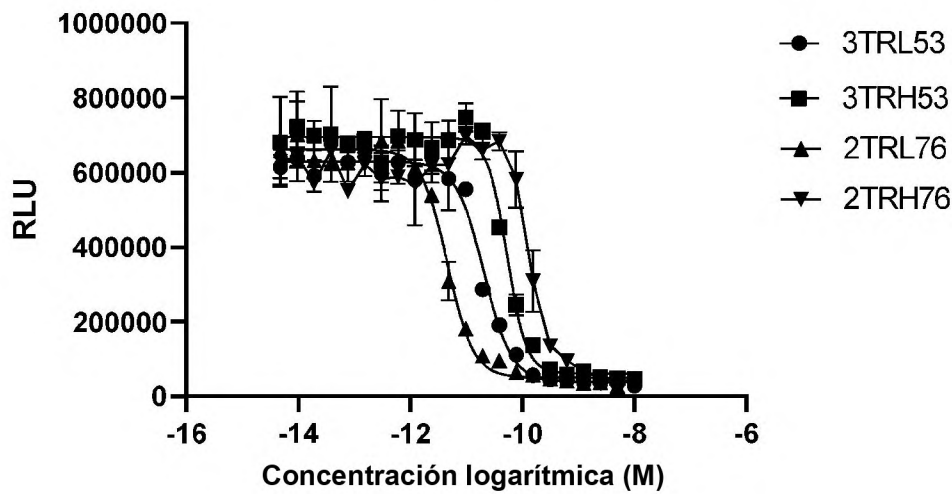


FIG. 15

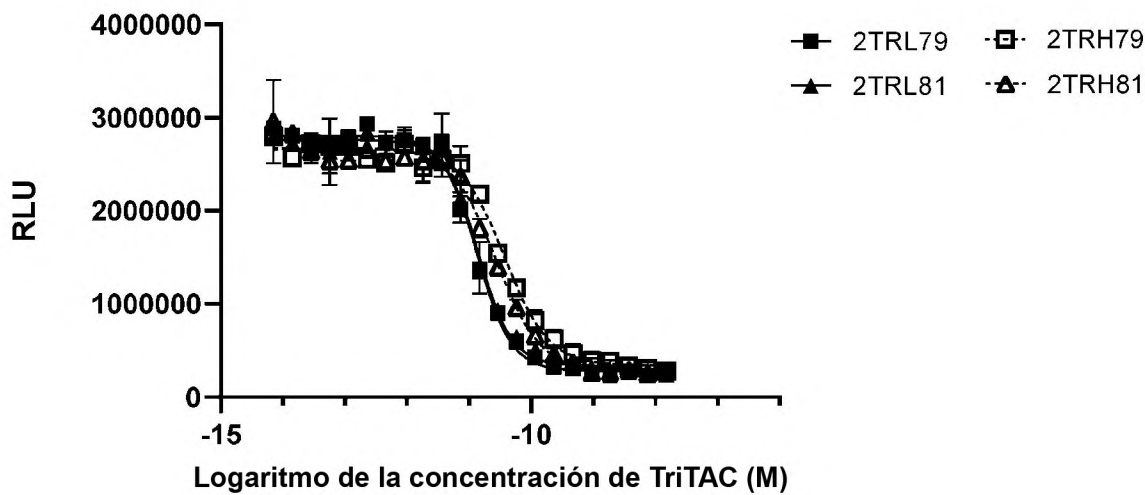


FIG. 16

9/18

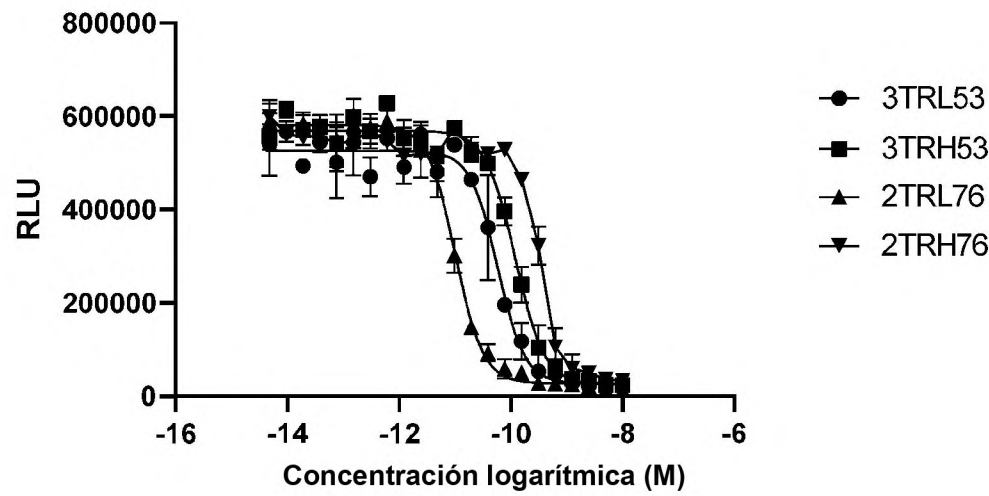


FIG. 17

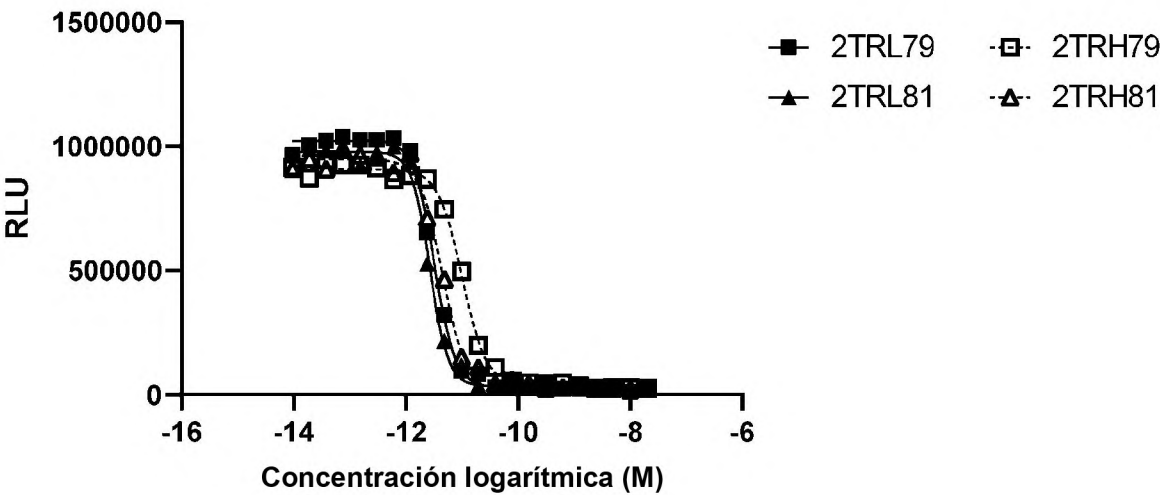


FIG. 18

10/18

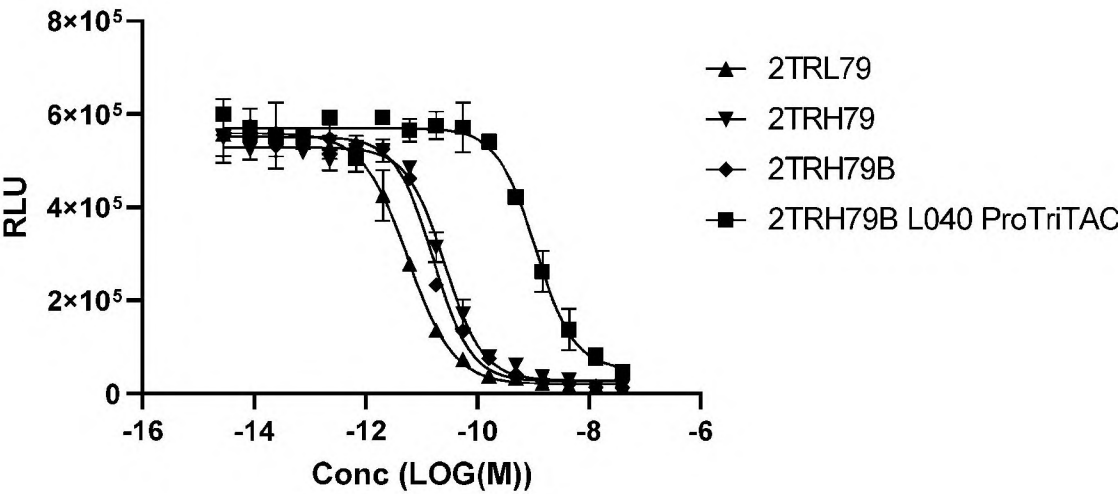


FIG. 19

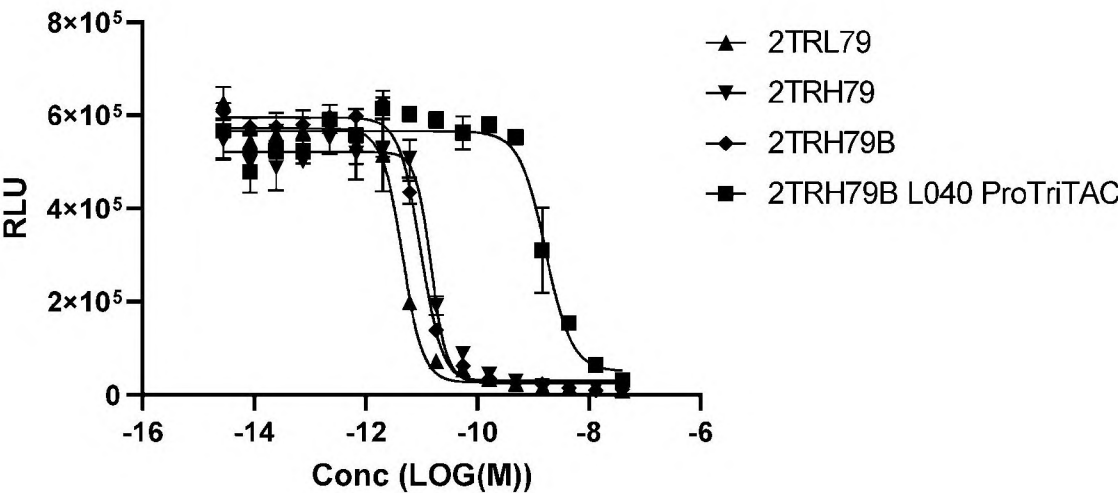


FIG. 20

11/18

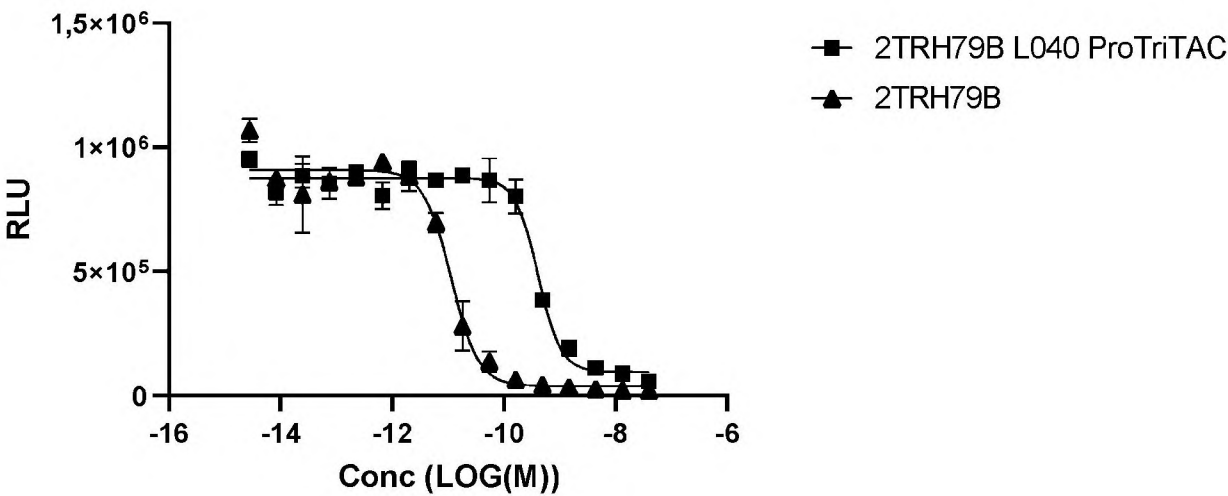


FIG. 21

Xenoinjerto terapéutico admix HCC70-002 en ratones NSG
ProTriTAC Trop2 2TRL79
Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral

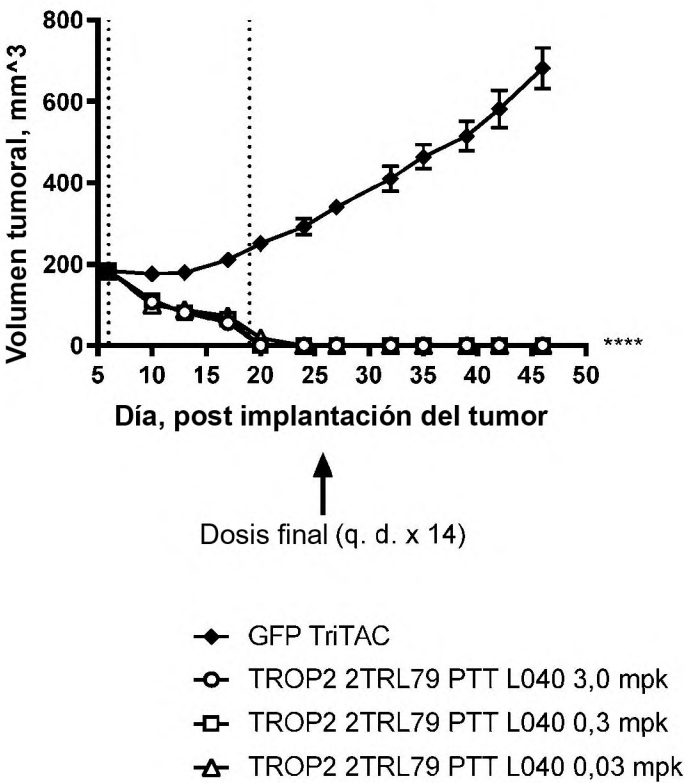
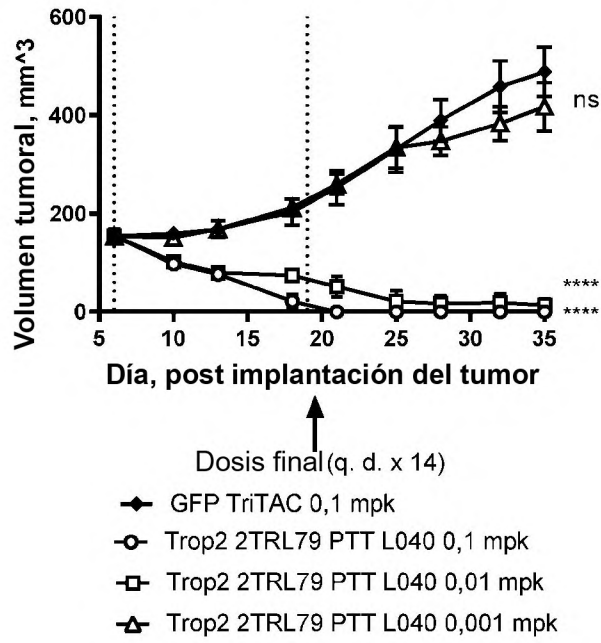


FIG. 22

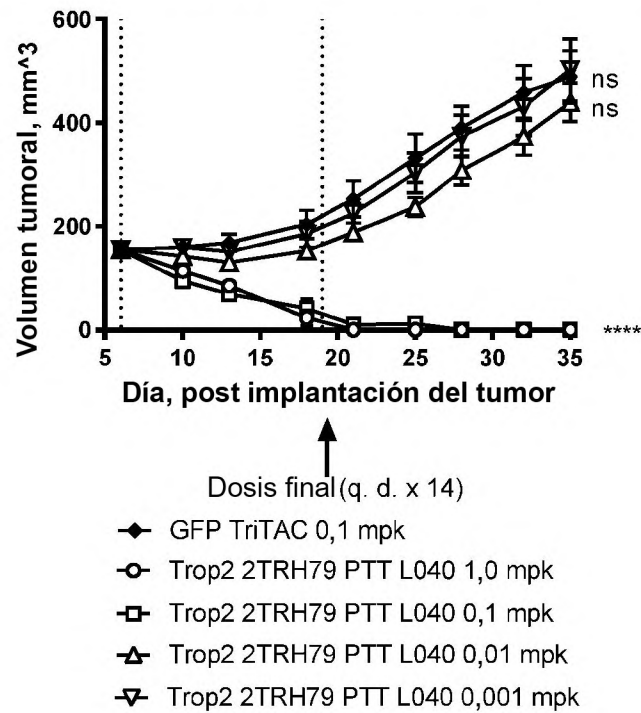
12/18

Xenoinjerto terapéutico admix HCC70-003 en ratones NSG
ProTriTAC Trop2 2TRL79
Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral

**FIG. 23**

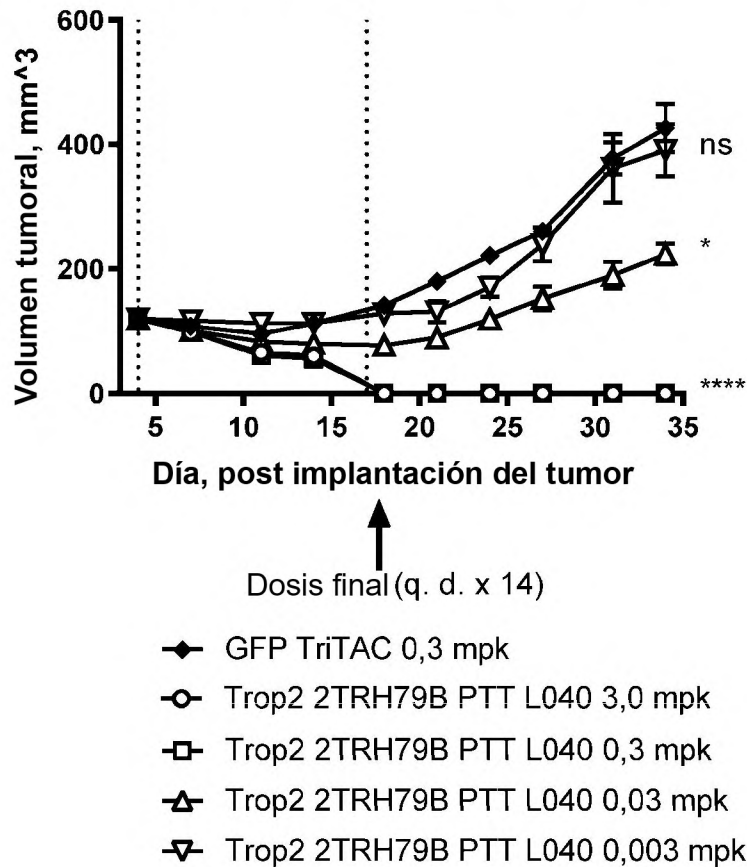
13/18

Xenoinjerto terapéutico admix HCC70-003 en ratones NSG
ProTriTAC Trop2 2TRL79
Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral

**FIG. 24**

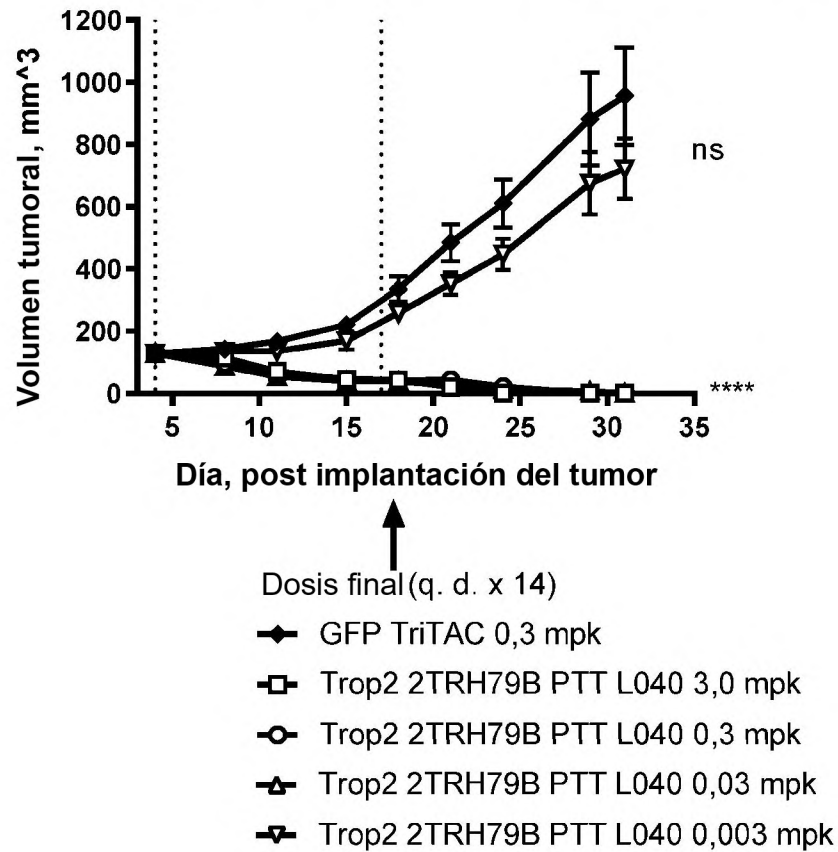
14/18

Xenoinjerto terapéutico admix Cal27-002 en ratones NSG
ProTriTAC Trop2 2TRH79B
Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral

**FIG. 25**

15/18

Xenoinjerto terapéutico admix HPAFII-012 en ratones NSG
ProTriTAC Trop2 2TRH79B
Efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral

**FIG. 26**

16/18

HCC70

(Carcinoma de mama)

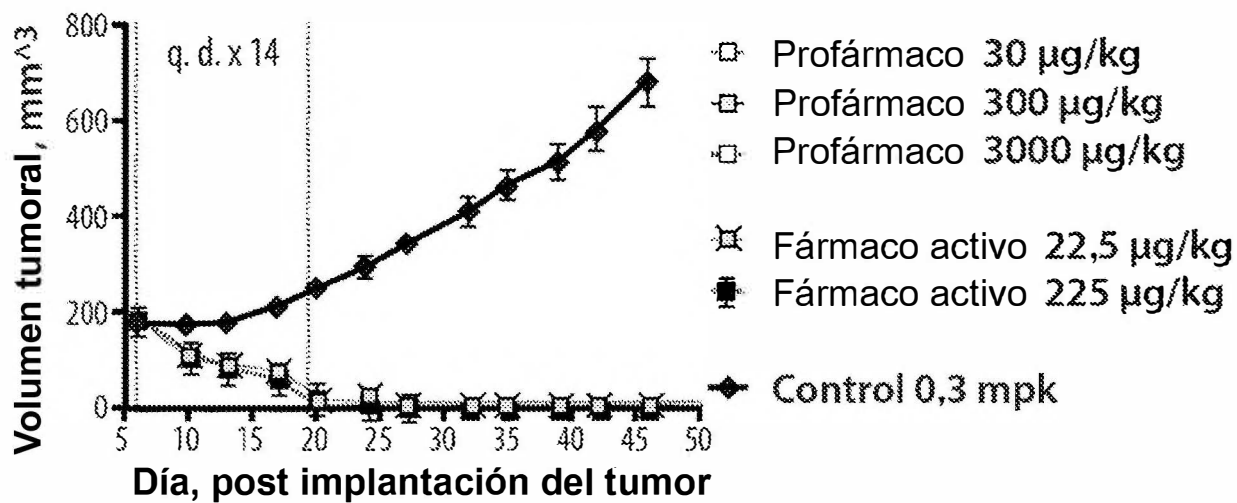


FIG. 27

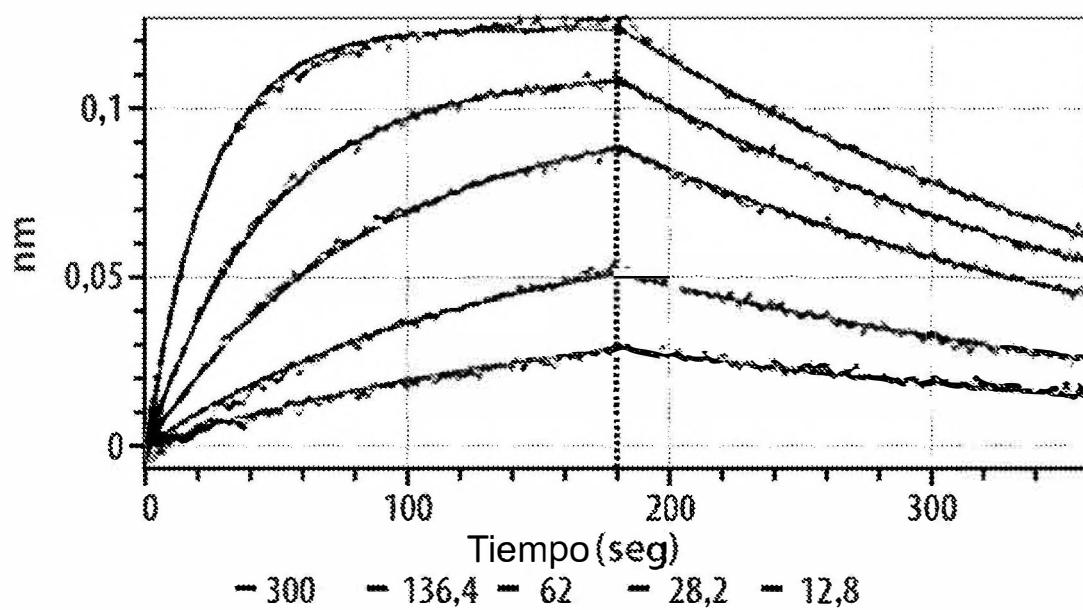


FIG. 28A

17/18

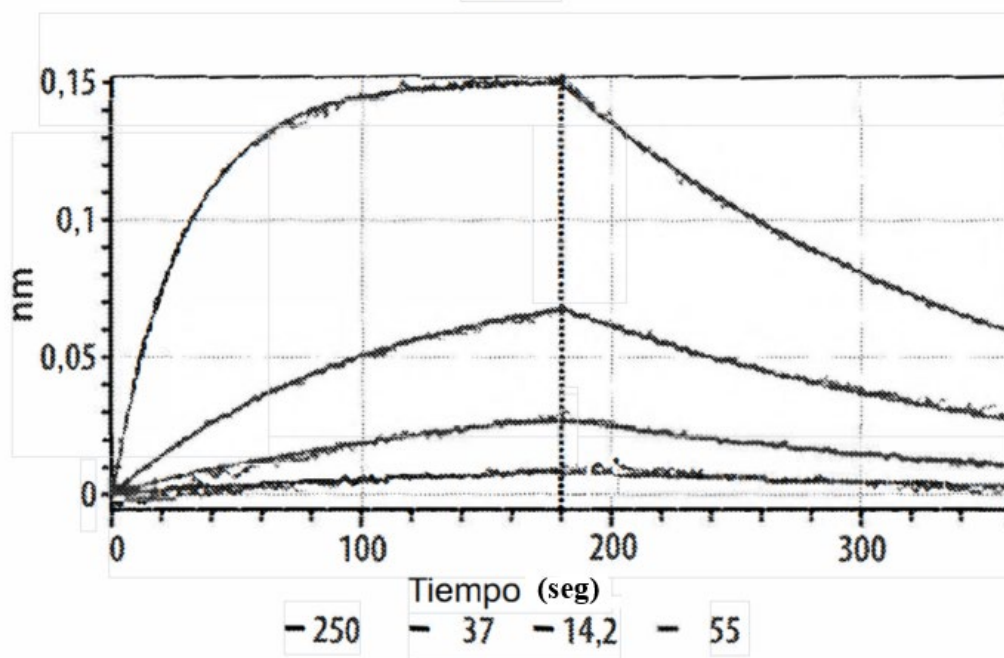


FIG. 28B

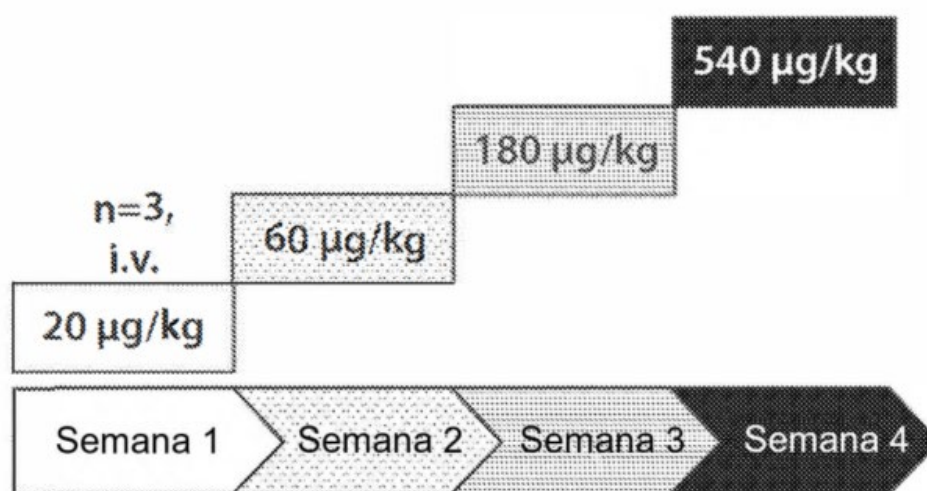


FIG. 29

18/18

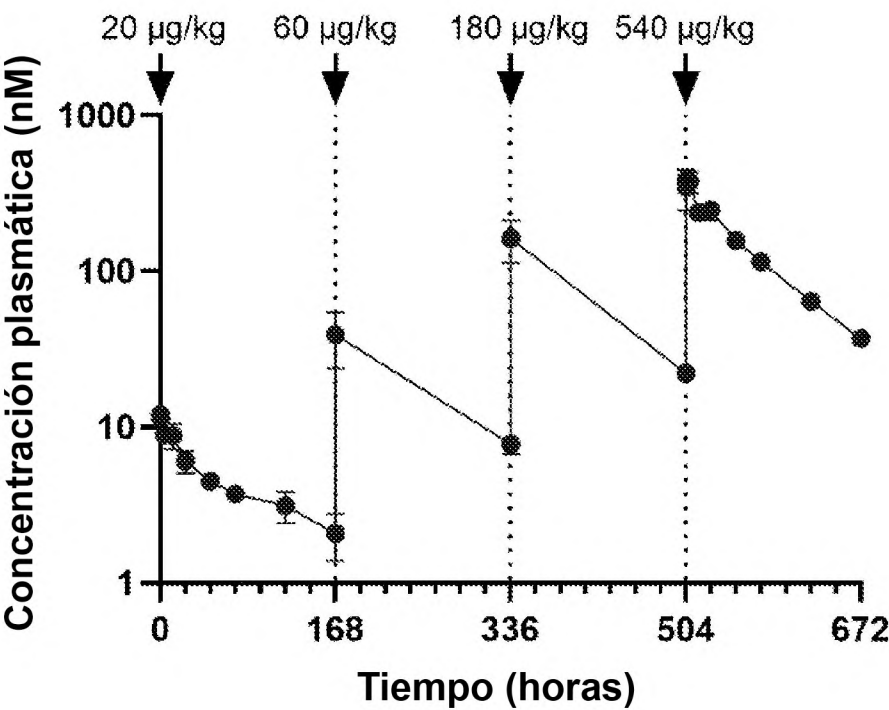


Fig. 30