

ANTICUERPOS MULTIESPECÍFICOS Y USOS DE ESTOS

CAMPO TÉCNICO

5 Esta descripción se relaciona con anticuerpos anti-CLEC5A (miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C), fragmentos de unión al antígeno de estos, conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) derivado de estos, y los usos de estos. Esta descripción también se
10 relaciona con anticuerpos multiespecíficos anti-CLEC5A (p. ej., anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos), y conjugados de fármacos de anticuerpos derivados de estos.

ANTECEDENTES

15 El miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A), también conocida como lectina-1 asociada a DAP12 mieloide (MDL-1), es una proteína
20 transmembrana tipo II y solo se expresa en los linajes mieloides que incluyen macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés). Como receptor de reconocimiento de patrones, CLEC5A transmite señales al citoplasma a través de la unión no covalente a
25 la proteína adaptadora DAP12. La fosforilación de DAP12 inicia entonces una cascada de señalización basada en la

quinasa Syk que da como resultado la activación de macrófagos y la liberación de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, que incluyen IL-6, TNF, CCL3 y CXCL8.

CLEC5A puede desencadenar una respuesta
5 inmunitaria relacionada con las células mieloides y se correlaciona con diversas infecciones y enfermedades inflamatorias. CLEC5A promueve la producción de altos niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en las infecciones por flavivirus, especialmente las infecciones
10 por el virus del dengue y la encefalitis japonesa, y los inhibidores de CLEC5A o mAb anti-CLEC5A pueden revertir la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que CLEC5A es una diana terapéutica prometedora para las infecciones por flavivirus. Además, similar en varias enfermedades
15 autoinmunitarias, se encuentra un alto nivel de CLEC5A en la artritis reumatoide activa y el activador CLEC5A aumenta el nivel de citocinas proinflamatorias. CLEC5A también es un contribuyente fundamental al desarrollo y progresión del cáncer. La expresión aberrantemente alta de CLEC5A se
20 correlaciona significativamente con la disminución de la supervivencia general en cáncer de ovario grave de alto grado (HGSOC, por sus siglas en inglés), cáncer gástrico, y glioma.

Un anticuerpo biespecífico es una proteína
25 artificial que puede unirse simultáneamente a dos tipos diferentes de antígenos o dos epítopos diferentes. Esta

especificidad dual abre una amplia gama de aplicaciones, incluida la redirección de las células T a las células tumorales, la doble focalización de diferentes mediadores de enfermedades y el suministro de cargas útiles a sitios dirigidos. La aprobación de catumaxomab (anti-EpCAM y anti-CD3) y blinatumomab (anti-CD19 y anti-CD3) se ha convertido en un hito importante en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos.

Como los anticuerpos biespecíficos tienen diversas aplicaciones, existe la necesidad de continuar desarrollando diversas terapéuticas basadas en anticuerpos biespecíficos.

Considerando el importante papel de CLEC5A en el sistema inmunitario, existe la necesidad de desarrollar un agente terapéutico dirigido a CLEC5A, particularmente anticuerpos biespecíficos dirigidos a CLEC5A.

SUMARIO

Esta descripción se relaciona con anticuerpos anti-CLEC5A, fragmento de unión al antígeno de estos, y los usos de estos. Esta descripción también se relaciona con anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos se unen específicamente a un antígeno asociado a tumores (TAA)

y al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C humano (CLEC5A). En algunas modalidades, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos tienen un Fc fortalecido. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este tiene una afinidad de unión aumentada al receptor FcγRIIa y/o al receptor FcγRIIIa. En algunas modalidades, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de estos tienen un Fc no funcional.

Los anticuerpos anti-CLEC5A descritos en la presente no son “agonistas típicos” en comparación con un anticuerpo de referencia usado en la descripción (p. ej., DX244). Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLEC5A descritos en la presente pueden mediar la fagocitosis de macrófagos (similar a DX244), pero con más potencia y niveles muy bajos de liberación de citocinas. Además, se demostró que los anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A descritos en la presente median la destrucción de diferentes células dirigidas que expresan TAA por células mieloides (p. ej., monocitos y macrófagos), a una relación de E:T muy baja y producen una liberación de citocina muy baja. Sin querer estar ligado a la teoría, se contempla que los anticuerpos anti-CLEC5A y los anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A descritos en la presente puedan usarse para hacer potenciales acopladores de células mieloides con una alta eficacia y un buen perfil de seguridad.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une a CLEC5A (miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C humano) que comprende: una región variable de cadena pesada (VH) que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en algunas modalidades, la región VH CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH CDR2 seleccionada, y la región VH CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH CDR3 seleccionada; y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las CDR 1, 2 y 3, en algunas modalidades, la región CDR1 VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR1 seleccionada, la región CDR2 VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR2 seleccionada, y la región CDR3 de VL comprende una región de aminoácidos VL CDR3 que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR2 seleccionada, y la región CDR3 VL comprende secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR3 seleccionada, en algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos VH 1, 2 y 3 seleccionadas y las CDR VL seleccionadas, las secuencias de 1, 2 y 3 aminoácidos son una de las siguientes:

- 5 (1) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 3, 5, 7, respectivamente, y
las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 8-10, respectivamente;
- 10 (2) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 4, 6, 7, respectivamente, y
las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 8-10, respectivamente;
- 15 (3) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 13, 15, 17, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 18-20, respectivamente;
- 20 (4) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 14, 16, 17, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 18-20, respectivamente;
- 25 (5) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con

núms. de ident.: 23, 25, 27, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 28-30, respectivamente;

5 (6) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 24, 26, 27, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
10 núms. de ident.: 28-30, respectivamente;

(7) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 33, 35, 37, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
15 3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 38-40, respectivamente;

(8) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 34, 36, 37, respectivamente,
20 y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 38-40, respectivamente;

(9) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
25 núms. de ident.: 43, 45, 47, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,

3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 48-50, respectivamente;

5 (10) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 44, 46, 47, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 48-50, respectivamente;

10 (11) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 53, 55, 57, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 58-60, respectivamente;

15 (12) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 54, 56, 57, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
20 núms. de ident.: 58-60, respectivamente;

(13) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 63, 65, 67, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
25 3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 68-70, respectivamente;

- 5 (14) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 64, 66, 67, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 68-70, respectivamente;
- 10 (15) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 73, 75, 77, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 78-80, respectivamente; y
- 15 (16) las secuencias de aminoácidos VH CDR 1, 2, 3
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 74, 76, 77, respectivamente,
y las secuencias de aminoácidos VL CDR 1, 2,
3 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 78-80, respectivamente.

20 En algunas modalidades, la VH comprende las CDR
1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en
las sec. con núms. de ident.: 3, 5, 7, respectivamente, y
la VL comprende CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
8-10, respectivamente, de acuerdo con la definición de
25 Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1,
2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las

sec. con núms. de ident.: 13, 15, 17, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 18-20, respectivamente, de acuerdo con la definición de Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 23, 25, 27, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 28-30, respectivamente, de acuerdo con la definición de Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 33, 35, 37, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 38-40, respectivamente, de acuerdo con la definición de Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 43, 45, 47, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 48-50, respectivamente, de acuerdo con la definición de Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 53, 55, 57, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de

aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
58-60, respectivamente, de acuerdo con la definición de
Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1,
2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las
5 sec. con núms. de ident.: 63, 65, 67, respectivamente, y
la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
68-70, respectivamente, de acuerdo con la definición de
Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1,
10 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las
sec. con núms. de ident.: 73, 75, 77, respectivamente, y
la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
78-80, respectivamente, de acuerdo con la definición de
15 Kabat. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1,
2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las
sec. con núms. de ident.: 4, 6, 7, respectivamente, y la
VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
20 8-10, respectivamente, de acuerdo con la definición de
Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR
1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en
las sec. con núms. de ident.: 14, 16, 17, respectivamente,
y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
25 aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
18-20, respectivamente, de acuerdo con la definición de

Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 24, 26, 27, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 28-30, respectivamente, de acuerdo con la definición de Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 34, 36, 37, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 38-40, respectivamente, de acuerdo con la definición de Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 44, 46, 47, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 48-50, respectivamente, de acuerdo con la definición de Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 54, 56, 57, respectivamente, y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.: 58-60, respectivamente, de acuerdo con la definición de Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en

las sec. con núms. de ident.: 64, 66, 67, respectivamente,
y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
68-70, respectivamente, de acuerdo con la definición de
5 Chothia. En algunas modalidades, la VH comprende las CDR
1, 2, 3 con las secuencias de aminoácidos establecidas en
las sec. con núms. de ident.: 74, 76, 77, respectivamente,
y la VL comprende las CDR 1, 2, 3 con las secuencias de
aminoácidos establecidas en las sec. con núms. de ident.:
10 78-80, respectivamente, de acuerdo con la definición de
Chothia.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un
anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se
une a CLEC5A que comprende una región variable de cadena
15 pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que
es al menos 90 % idéntica a una secuencia de VH
seleccionada, y una región variable de cadena ligera (VL)
que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos
90 % idéntica a una secuencia de VL seleccionada, en algunas
20 modalidades, la secuencia de VH seleccionada y la secuencia
de VL seleccionada son una de las siguientes:

(1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
25 12;

- (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
22;
- 5 (3) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 31, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
32;
- 10 (4) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 41, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
42;
- 15 (5) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 51, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
52;
- 20 (6) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 61, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
62;
- 25 (7) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 71, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
72;
- (8) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 81, y la secuencia de VL

seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
82;

5 (9) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
84;

10 (10) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86;

(11) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 87, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
88;

15 (12) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 89, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
90; y

20 (13) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 91, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
92.

En algunas modalidades, la VH comprende la
secuencia de la sec. con núm. de ident.: 11 y la VL
25 comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 12.
En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la

sec. con núm. de ident.: 21 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 22. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 31 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 32. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 41 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 42. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 51 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 52. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 61 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 62. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 71 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 72. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 81 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 82. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 83 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 84. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 85 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 86. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 87 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 88. En algunas modalidades,

la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 89 y la VL comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 90. En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 91 y la VL
5 comprende la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 92.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este se une específicamente a CLEC5A humana, de ratón o mono.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento
10 de unión al antígeno de este puede mediar la fagocitosis de macrófagos (p. ej., con una eficacia de destrucción celular diana de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 %, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, o al menos
15 150 % en comparación con la de un anticuerpo de referencia (p. ej., DX244)), y/o

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede inducir niveles bajos de liberación de citocina (p. ej., IL-6 o TNF α) (p. ej.,
20 menos de 80 %, menos de 70 %, menos de 60 %, menos de 50 %, menos de 40 %, menos de 30 %, menos de 20 %, menos de 10 %, menos de 5 %, o menos de 1 % en comparación con la inducida por un anticuerpo de referencia (p. ej., DX244)).

En un aspecto, la descripción se relaciona con un
25 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une a CLEC5A, en algunas modalidades, el anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno de este puede mediar la fagocitosis de macrófagos (p. ej., con una eficacia de destrucción de células diana de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 100 %, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, o al menos 150 % en comparación con la de un anticuerpo de referencia (p. ej., DX244)), y/o en algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede inducir un nivel bajo de liberación de citocina (p. ej., IL-6 o TNF α) (p. ej., menos de 80 %, menos de 70 %, menos de 60 %, menos de 50 %, menos de 40 %, menos de 30 %, menos de 20 %, menos de 10 %, menos de 5 %, o menos de 1 % en comparación con el inducido por un anticuerpo de referencia (p. ej., DX244)).

En un aspecto, la descripción se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: i) un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno, en algunas modalidades, el primer antígeno es un antígeno asociado a tumores (TAA, por sus siglas en inglés); y ii) un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A).

En un aspecto, la descripción se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: i) un primer dominio de unión al antígeno que

se une específicamente a un primer antígeno, en algunas modalidades, el primer antígeno es una diana de la enfermedad autoinmunitaria; y ii) un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este tiene uno o más de los siguientes efectos:

10 i) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede mediar la destrucción de células diana por células mieloides (p. ej., monocitos y/o macrófagos (p. ej., macrófagos M0, M1 y/o M2));

15 ii) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede mediar la destrucción de células diana por células mieloides (p. ej., monocitos y/o macrófagos) a una baja relación E:T (célula efectora: célula diana), opcionalmente en algunas modalidades, la relación E:T baja es menor que 1:10, menor que 1:9, menor que 1:8, menor que 1:7, menor que 1:6, menor que 1:5, menor que 1:4, menor que 1:3, menor que 1:2, menor que 1:1, menor que 2:1, menor que 3:1, menor que 4:1, menor que 5:1, menor que 6:1, menor que 7:1, menor que 8:1, menor que 9:1, o menor que 10:1); y

20

25

iii) el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede inducir un nivel bajo de liberación de citocinas (p. ej., IL-6 o TNF α) de células mieloides (p. ej., monocitos y/o macrófagos), p. ej., menos de 80 %, menos de 70 %, menos de 60 %, menos de 50 %, menos de 40 %, menos de 30 %, menos de 20 %, menos de 10 %, menos de 5 %, o menos de 1 % en comparación con el inducido por un anticuerpo de referencia.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2). En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento monocatenario (scFv), en algunas modalidades, el VH2 y VL2 están enlazados por un primer enlazador. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se conecta al C-terminal de una cadena ligera a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende además una región Fc. En algunas modalidades, el C-terminal de la VH1 del primer dominio de unión al antígeno se conecta a

la región Fc, opcionalmente a través de un dominio CH1. En algunas modalidades, el C-terminal de la VH1 del primer dominio de unión al antígeno se conecta al N-terminal de una región Fc, y el N-terminal del segundo dominio de unión al antígeno se conecta al C-terminal de la región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una primera cadena que comprende VH1 y una primera cadena ligera que comprende la VL1; y una segunda cadena pesada que comprende la VH2 y una segunda cadena ligera que comprende la VL2.

En algunas modalidades, la primera cadena pesada comprende una o más mutaciones de botón; y la segunda cadena pesada comprende una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada comprende una o más mutaciones de ojal; y la segunda cadena pesada comprende una o más mutaciones de botón.

En algunas modalidades, la región Fc es una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana. En algunas modificaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc comprende uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos (toda la numeración es de acuerdo con la numeración EU):

- (1) una alanina (A) en la posición 236; una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332;
- (2) una alanina (A) en la posición 236; un ácido aspártico (D) en la posición 293; una leucina

(L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332;

(3) una alanina (A) en la posición 236;

(4) una alanina (A) en la posición 236; un ácido aspártico (D) en la posición 293; y un ácido glutámico (E) en la posición 332;

(5) un ácido aspártico (D) en la posición 293 y un ácido glutámico (E) en la posición 332;

(6) un ácido aspártico (D) en la posición 293; una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332; y

(7) una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235 y una glicina (G) en la posición 329;

opcionalmente, la región Fc está afucosilada.

En algunas modalidades, el antígeno asociado a tumores (TAA) es HER2, CD79b, EGFR, EpCAM, BCMA, CD38, GPRC5D, DLL3, CD70, GPC3, mesotelina, ligando de Fas (FasL), CD1d, glicolípidos de membrana, globotriaosilceramida (Gb3Cer/CD77), gangliósidos (GD2, GD3 y GM2), CD34, CD45, antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR), CD123, CLL1, CD105, CD71, SSC, MAGE, MUC16, CD19, WT-1, B7H3, TEM8, CD22, LI-CAM, ROR-1, CEA, 4-1BB, ETA, 5T4, antígeno de adenocarcinoma, alfa-fetoproteína (AFP), BAFF, célula de linfoma B, antígeno CA242, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD133, CD152,

CD20, CD125, CD200, CD221, CD23 (receptor de IgE), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DR5, CD3, FAP, dominio extra B de fibronectina, receptor de folato 1, GD2, 5 gangliósido GD3, glicoproteína 75, GPNMB, HGF, quinasa del receptor del factor de dispersión humano, receptor de IGF-1, IGF-I, IgG1, IL-5, IL-13, IL-6, IL-15, receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I, integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, MSLN, MS4A1, MUC1, mucina CanAg, ácido N-glicolilneuramínico, NPC-1C, PD-1, PD-L1, PDGF-R α , TWEAK, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2 o vimentina.

15 En algunas modalidades, la diana de la enfermedad autoinmunitaria es CD79b, CD38, ACHE, BAFF, BTK, CCL2, CD19, CD20, CD25, CD40, CD52, CD80, CD86, ETAR, ETBR, FCGRT, GM-CSF, JAK1, IFNAR, IFNB1, IFNG, IgE, IgG Fc, IL1A, IL1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL6R, IL7, IL-12, IL-13, IL-17, IL-20 18, IL-21, IL-22, IL-23, integrina, ITG-A4B1, ITG-A4B7, ITG-AVB6, TL1A, TNF- α , TNF- β , TNFSF13B, TSLP, TYK2, o VEGFR.

En algunas modalidades, el TAA es HER2. En algunas modalidades,

25 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.

con núms. de ident.: 100, 102, 104,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
5 105-107, respectivamente; y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2
seleccionadas y las secuencias de aminoácidos
de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se
seleccionan de una de las secuencias
10 descritas en la presente; o
(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,
2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.
con núms. de ident.: 101, 103, 104,
respectivamente, y las secuencias de
15 aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
105-107, respectivamente; y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2
seleccionadas y las secuencias de aminoácidos
20 de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se
seleccionan de una de las secuencias
descritas en la presente.

En algunas modalidades, el TAA o diana de
enfermedad autoinmunitaria es CD79b. En algunas
25 modalidades,

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 200, 202, 204, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205-207, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente; o

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 201, 203, 204, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205-207, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente.

En algunas modalidades, el inhibidor TAA es EGFR.

En algunas modalidades,

- 5 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 126, 128, 130, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 131-133, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente;
- 10
- 15 (2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 127, 129, 130, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 131-133, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente;
- 20
- 25 (3) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.

con núms. de ident.: 136, 138, 140, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 141-143, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente; o

(4) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 137, 139, 140, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 141-143, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente.

En algunas modalidades, el TAA es EpCAM. En algunas modalidades,

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.

con núms. de ident.: 150, 152, 154,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
5 155-157, respectivamente; y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2
seleccionadas y las secuencias de aminoácidos
de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se
seleccionan de una de las secuencias
10 descritas en la presente; o
(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,
2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.
con núms. de ident.: 151, 153, 154,
respectivamente, y las secuencias de
15 aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
155-157, respectivamente; y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2
seleccionadas y las secuencias de aminoácidos
20 de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se
seleccionan de una de las secuencias
descritas en la presente;

En algunas modalidades, el TAA o diana de
enfermedad autoinmunitaria es GPRC5D. En algunas
25 modalidades,

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 164, 166, 168, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169-171, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente; o

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 165, 167, 168, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169-171, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente.

En algunas modalidades, el TAA o diana de enfermedad autoinmunitaria es BCMA. En algunas modalidades,

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 176, 178, 180, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 181-183, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente; o

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 177, 179, 180, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 181-183, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente.

En algunas modalidades, el TAA o diana de enfermedad autoinmunitaria es CD38. En algunas modalidades,

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 188, 190, 192, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193-195, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente; o

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 189, 191, 192, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193-195, respectivamente; y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se seleccionan de una de las secuencias descritas en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que

compite de forma cruzada con el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un vector que comprende el ácido nucleico descrito en la presente. En un aspecto, la descripción se relaciona con una célula que comprende el vector descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un método para disminuir la tasa de crecimiento tumoral, el método comprende poner en contacto una célula tumoral con una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un método para matar una célula tumoral, el método comprende poner en contacto una célula tumoral con una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un método para aumentar la respuesta inmunitaria en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que comprende el anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un método de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, el
5 método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente al sujeto.

En algunas modalidades, el cáncer es un tumor
10 sólido o un tumor de sangre. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer esofágico, cáncer traqueal, cáncer gástrico cáncer de vejiga, cáncer uterino, cáncer rectal, cáncer del intestino
15 delgado, cáncer de páncreas y/o cáncer de hígado. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma difuso de células B grandes, leucemia aguda de células B, leucemia linfocítica crónica, leucemia prelinfocítica de células B, linfoma de bazo con linfocitos
20 vellosos, linfoma de células pilosas, linfoma folicular y/o linfoma de células del manto. En algunas modalidades, el sujeto se trata adicionalmente con una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA4, un
25 anticuerpo anti-CD40 y/o un anticuerpo anti-PD-L1.

En un aspecto, la descripción se relaciona con un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad autoinmunitaria, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente al sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, púrpura trombocitopénica inmunitaria, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedades relacionadas con IgG4, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, arteritis de células gigantes, enfermedad de Takayasu, enfermedad por crioglobulinas, anemia hemolítica autoinmune caliente y vasculitis asociadas a anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA), incluidas, por ejemplo, granulomatosis con poliangéitis (GPA) (granulomatosis de Wegener) y poliangéitis microscópica (MPA). En algunas modalidades, la enfermedad autoinmunitaria es esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y/o artritis reumatoide.

En un aspecto, la descripción se relaciona con una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, el término “dominio de unión al antígeno” se relaciona con uno o más dominios

proteicos (p. ej., formados a partir de aminoácidos de un único polipéptido o formados a partir de aminoácidos de dos o más polipéptidos (p. ej., los mismos o diferentes polipéptidos) que son capaces de unirse específicamente a uno o más antígenos diferentes (p. ej., un antígeno efector o antígeno tumoral). En algunos ejemplos, un dominio de unión al antígeno puede unirse a un antígeno o epítipo con especificidad y afinidad similar a la de los anticuerpos de origen natural. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno puede ser un anticuerpo o un fragmento de este. Un ejemplo de un dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno formado por VH-VL. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno puede incluir un supercóntigo alternativo. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno es un VHH. En la presente se describen ejemplos no limitantes de dominios de unión al antígeno. Los ejemplos adicionales de dominios de unión al antígeno se conocen en la técnica. En algunos ejemplos, un dominio de unión al antígeno puede unirse a un único antígeno (p. ej., uno de un antígeno efector y un antígeno tumoral).

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo” se relaciona con cualquier molécula de unión al antígeno que contiene al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) región determinante complementaria (CDR) (p. ej., cualquiera de las tres CDR

de una cadena ligera de inmunoglobulina o cualquiera de las tres CDR de una cadena pesada de inmunoglobulina) y es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen: anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos monocatenario, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados. En algunas modalidades, un anticuerpo puede contener una región Fc de un anticuerpo humano. El término anticuerpo también incluye derivados, p. ej., anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocadena, diacuerpos, anticuerpos lineales y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Como se usa en la presente, el término “fragmento de unión al antígeno” se relaciona con una porción de un anticuerpo de longitud completa, en donde la porción del anticuerpo es capaz de unirse específicamente a un antígeno. En algunas modalidades, el fragmento de unión al antígeno contiene al menos un dominio variable (p. ej., un dominio variable de una cadena pesada o un dominio variable de cadena ligera). Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpo incluyen, p. ej., fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo multiespecífico” es un anticuerpo que incluye dos o más

dominios de unión al antígeno diferentes que se unen colectivamente específicamente a dos o más epítopos diferentes. Los dos o más epítopos diferentes pueden ser epítopos en el mismo antígeno (p. ej., un único polipéptido presente en la superficie de una célula) o en diferentes antígenos (p. ej., diferentes proteínas presentes en la superficie de la misma célula o presentes en la superficie de diferentes células). En algunos aspectos, un anticuerpo multiespecífico se une a dos epítopos diferentes (es decir, un “anticuerpo biespecífico”). En algunos aspectos, un anticuerpo multiespecífico se une a tres epítopos diferentes (es decir, un “anticuerpo triespecífico”). En algunos aspectos, un anticuerpo multiespecífico se une a cuatro epítopos diferentes (es decir, un “anticuerpo cuadespecífico”). En algunos aspectos, un anticuerpo multiespecífico se une a cinco epítopos diferentes (es decir, un “anticuerpo quintespecífico”). Cada especificidad de unión puede estar presente en cualquier valencia adecuada. En la presente se describen ejemplos no limitantes de anticuerpos multiespecíficos.

Como se usa en la presente, el término “anticuerpo biespecífico” se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes. Los epítopos pueden estar en el mismo antígeno o en diferentes antígenos.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales se describen en la presente descripción para su uso en la presente invención; otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica también pueden usarse. Los materiales, los métodos, y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, las solicitudes de patentes, las patentes, las secuencias, las entradas de bases de datos, y otras referencias mencionadas en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, que incluye las definiciones.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, y de las reivindicaciones.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A muestra la estrategia de limitación para evaluar subconjuntos de células inmunitarias en PBMC humanas.

25

La Figura 1B muestra la expresión de CLEC5A en subconjuntos de células inmunitarias en PBMC humanas.

La Figura 2A muestra la estrategia de limitación utilizada para evaluar subconjuntos de células inmunitarias
5 en tumores sólidos humanos.

Las Figuras 2B-2C muestran la expresión de CLEC5A en células mieloides asociadas a tumores.

La Figura 3A muestra la estrategia de limitación utilizada para caracterizar células mieloides no
10 neutrófilos.

La Figura 3B muestra la caracterización de macrófagos asociados a tumores en tumores sólidos humanos.

Las Figuras 3C-3D muestran la expresión de CLEC5A en macrófagos asociados a tumores en tumores sólidos
15 humanos.

La Figura 4 muestra afinidades de unión de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos a macrófagos humanos.

La Figura 5 muestra la liberación de $\text{TNF}\alpha$ de macrófagos M1 en placas quiméricas recubiertas con
20 anticuerpos anti-CLEC5A.

La Figura 6 muestra afinidades de unión de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos a CLEC5A de ratón.

Las Figuras 7A-7B muestran resultados de unión de BLI de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos a CLEC5A humana.

Las Figuras 8A-8E muestran anticuerpos anti-CLEC5A humanizados que se enlazan a CLEC5A humano, según se determina mediante ELISA.

Las Figuras 9A-9F muestran ilustraciones
5 esquemáticas de ejemplos de anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A.

La Figura 10 muestra anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A que se enlazan a macrófagos humanos.

La Figura 11 muestra anticuerpos biespecíficos
10 TAA/CLEC5A que se enlazan a macrófagos humanos.

La Figura 12 muestra anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A que se unen a macrófagos humanos.

La Figura 13 muestra anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A que se enlazan a CLEC5A humano.

La Figura 14 muestra anticuerpos biespecíficos
15 HER2/CLEC5A que se enlazan a HER2 humano.

La Figura 15 muestra anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A que se enlazan al EGFR humano.

La Figura 16 muestra anticuerpos biespecíficos
20 EpCAM/CLEC5A que se enlazan a células DLD-1.

La Figura 17 muestra anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A que se enlazan a células Ramos.

Las Figuras 18A-18C muestran la destrucción celular SK-BR-3 mediada por anticuerpos biespecíficos
25 HER2/CLEC5A mediada por anticuerpos biespecíficos por macrófagos M0 (relación de E:T de 5:1).

La Figura 19 muestra la destrucción de células SK-BR-3 mediada por anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A por macrófagos M1 y M2 (relación de E:T de 5:1).

5 La Figura 20 muestra la liberación de IFN- γ a partir de la destrucción de células SK-BR-3 por macrófagos M1 y M2 mediada por el anticuerpo HER2/CLEC5A (relación de E:T de 5:1).

Las Figuras 21A-21C muestran la destrucción de células SK-BR-3 mediada por anticuerpos biespecíficos
10 HER2/CLEC5A por macrófagos M0 en presencia de medios (Figura 21A), plasma (Figura 21B) o hIgG1 (Figura 21C).

La Figura 22 muestra la destrucción de células DLD-1 mediada por anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A por macrófagos M0.

15 La Figura 23 muestra la destrucción de células DLD-1 mediada por anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A por macrófagos M0.

La Figura 24 muestra el nivel de expresión de EpCAM en diversas líneas celulares cancerosas.

20 Las Figuras 25A-25F muestran la destrucción de células cancerosas mediada por anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A por macrófagos M0.

La Figura 26 muestra la destrucción de células cancerosas de mieloma múltiple mediada por diferentes
25 acopladores de células mieloides por PBMC.

La Figura 27 muestra el nivel de expresión de CD79b en líneas celulares de linfoma maligno y células B en donantes de PBMC sanos.

5 Las Figuras 28A-28C muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 1).

Las Figuras 29A-29B muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 2).

10 Las Figuras 30A-30C muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 3).

Las Figuras 31A-31B muestran el nivel de IL-6 a partir de la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

La Figura 32 muestra el nivel de TNF α a partir de la destrucción mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos.

20 Las Figuras 33A-33C muestran la destrucción de células B endógenas mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 1).

Las Figuras 34A-34C muestran la destrucción de células B endógenas mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 2).

Las Figuras 35A-35B muestran la destrucción de células B endógenas mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por PBMC (prueba 3).

5 La Figura 36 muestra la liberación de TNF α a partir de la destrucción de PBMC mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células B endógenas.

Las Figuras 37A-37F muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M0 (prueba 1).

10 Las Figuras 38A-38D muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de macrófagos M0 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos (prueba 1).

15 Las Figuras 39A-39B muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T (prueba 2).

20 Las Figuras 40A-40B muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de macrófagos M0 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos (prueba 2).

Las Figuras 41A-41C muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediada por macrófagos M0 (prueba 3).

25 La Figura 42 muestra la liberación de citocinas a partir de la destrucción de macrófagos M0 mediada por

anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos (prueba 3).

La Figura 43 muestra la tasa de supervivencia de macrófagos M0 a partir de la destrucción de macrófagos M0
5 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos (prueba 3).

Las Figuras 44A-44B muestran la destrucción de células Daudi mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M0 en diferentes relaciones de
10 E:T (prueba 1).

Las Figuras 45A-45B muestran la destrucción de células Daudi mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T (prueba 2).

15 Las Figuras 46A-46D muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de células Daudi de macrófagos M0 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

Las Figuras 47A-47B muestran la destrucción de
20 células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M1 (prueba 1).

Las Figuras 48A-48B muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de macrófagos M1 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de
25 células Ramos (prueba 1).

La Figura 49 muestra la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M1 (prueba 2).

5 La Figura 50 muestra la liberación de citocina a partir de la destrucción de células Ramos por macrófagos M1 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A (prueba 2).

10 La Figura 51 muestra la tasa de supervivencia de macrófagos M1 a partir de la destrucción de células Ramos por macrófagos M1 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A (prueba 2).

La Figura 52 muestra la destrucción de células Daudi mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M1.

15 La Figura 53 muestra la liberación de citocinas a partir de la destrucción de células Daudi por macrófagos M1 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

20 Las Figuras 54A-54D muestran la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M2 (prueba 1).

Las Figuras 55A-55D muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de macrófagos M2 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos (prueba 1).

La Figura 56 muestra la destrucción de células Ramos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A por macrófagos M2 (prueba 2).

5 La Figura 57 muestra la liberación de citocinas a partir de la destrucción de células Ramos por macrófagos M2 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A (prueba 2).

La Figura 58 muestra la tasa de supervivencia de macrófagos M2 a partir de la destrucción de células Ramos por macrófagos M2 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A (prueba 2).

10

La Figura 59 muestra la destrucción de células Daudi por macrófagos M2 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A en diferentes relaciones de E:T.

15 La Figura 60 muestra la liberación de citocinas a partir de la destrucción de células Daudi por macrófagos M2 mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

Las Figuras 61A-61B muestran la destrucción de células Ramos por monocitos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

20

Las Figuras 62A-62B muestran la liberación de citocinas a partir de la destrucción de células Ramos por monocitos mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A.

25 Las Figuras 63A-63B muestran la tasa de supervivencia de monocitos a partir de la destrucción de

células Ramos por monocitos mediada por anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A.

Las Figuras 64A-64B muestran la destrucción de
células B por monocitos mediada por anticuerpos
5 bienespecíficos CD79b/CLEC5A.

Las Figuras 65A-65B muestran la liberación de
citocinas a partir de monocitos mediados por anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A que matan las células B.

Las Figuras 66A-66B muestran la tasa de
10 supervivencia de monocitos a partir de la destrucción de
células B por monocitos mediada por anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión al antígeno de este es una proteína artificial que
5 puede unirse simultáneamente a dos o más de dos epítomos diferentes (p. ej., en dos antígenos diferentes). En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión al antígeno de este puede tener dos
10 brazos. Cada brazo puede tener una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, formando un dominio de unión al antígeno (o una región de unión al antígeno). Los dos brazos pueden unirse a dos antígenos diferentes. En algunas modalidades, pueden añadirse
15 dominios de unión al antígeno adicionales a un anticuerpo monoclonal (p. ej., al C-terminal de la cadena ligera o la cadena pesada).

La presente descripción proporciona varios anticuerpos anti-CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno
20 de estos, y métodos para usar estos anticuerpos anti-CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno para inhibir el crecimiento tumoral, tratar cánceres y tratar enfermedades autoinmunitarias.

Esta descripción se relaciona con anticuerpos
25 multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden un primer dominio

de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno asociado a tumores (TAA) y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

Miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo

5 C humano (CLEC5A)

El miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C humano (CLEC5A), también conocido como lectina-1 asociada a DAP12 mieloide (MDL-1), es una proteína transmembrana tipo II. Las lectinas de tipo C se

10 caracterizan por un dominio estructural de lectina tipo C (CTLD) común que puede unirse a ligandos de glicano y no glicano de una manera independiente del Ca^{2+} . Los CTLD que se unen a los glicanos de manera dependiente de Ca^{2+} se conocen como “dominios de reconocimiento de carbohidratos”

15 (CRD, por sus siglas en inglés). La lectina mieloide tipo C CLEC5A es una proteína de membrana tipo II acoplada a tirosina quinasa del bazo (Syk) que comprende un CTLD C-terminal y un dominio citoplásmico N-terminal corto. Entre los 15 grupos de lectinas de tipo C, CLEC5A cae en el Grupo

20 V (la familia de receptores de células NK), que incluye CLEC7A (Dectina-1), CLEC5A, CLEC2, CLEC1, receptores NK (como NKG2D, la familia NKR1p, la familia NKG2, CD69 y CD94), antígeno funcional asociado a mastocitos (MAFA, por sus siglas en inglés), osteoclastos lectina inhibidora

25 (OCIL, por sus siglas en inglés), y CD72. Similar a NKG2D, CLEC5A envía señales a través de la proteína activadora

DNAX 12 (DAP12) que contiene ITAM cuando es fosforilada por Src tras la activación.

El ARNm de CLEC5A humano codifica un polipéptido de 165 residuos con un péptido señal N-terminal (a.a. 1–
5 22), seguido de un dominio citoplásmico intracelular corto (a.a. 23–56), un dominio transmembrana (a.a. 57–70) y un dominio extracelular (a.a. 71–165). El dominio transmembrana contiene un aminoácido cargado positivamente, Lys-58, que recluta DAP10 y DAP12 para asociarse con CLEC5A
10 después de la activación. CLEC5A se expresa principalmente por células mieloides, que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, y además está regulada positivamente por interferón-gamma (IFN- γ). Además, la expresión de CLEC5A está bajo el control del factor de
15 transcripción PU.1, que es un regulador central de la diferenciación celular mieloide. La expresión de CLEC5A está regulada positivamente por el factor nuclear 2 relacionado con el factor eritroide 2 (Nrf2), lo que sugiere que CLEC5A está regulado por estrés oxidativo.

20 Una estructura cristalina de rayos X ha revelado que CLEC5A es una proteína homodimétrica cuando se une al serotipo del virus del dengue. Además, la estructura cristalina CLEC5A reveló flexibilidad conformacional, lo que sugiere que CLEC5A puede adoptar diversas
25 conformaciones in vivo y que su conformación es dependiente de ligando.

Si bien los receptores NK reconocen antígenos autólogos asociados al estrés y son cruciales para la inmunovigilancia, las lectinas de tipo C acopladas a la tirosina quinasa del bazo del grupo V (Syk) en las células mieloides reconocen diversos antígenos exógenos y endógenos y están involucrados en la defensa del huésped, la inflamación aséptica, la activación plaquetaria y el desarrollo. Se demostró que CLEC5A interactúa con los grupos glicano en el virus del dengue (DV, por sus siglas en inglés), el virus de la encefalitis japonesa (JEV, por sus siglas en inglés) y el virus de la influenza tipo A (IAV). Además, se ha encontrado que CLEC5A interactúa con disacáridos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) sobre bacterias grampositivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*). Además, CLEC5A tiene un papel crítico en las respuestas inflamatorias asociadas con la artritis reumatoide inducida por el colágeno y la inflamación hepática inducida por Concanavalina A. CLEC5A también interactúa con exosomas liberados de plaquetas activadas.

Una revisión detallada de CLEC5A y sus funciones pueden encontrarse en Sung, Pei-Shan, Wei-Chiao Chang, and Shie-Liang Hsieh. "CLEC5A: a promiscuous pattern recognition receptor to microbes and beyond" *Lectin in Host Defense Against Microbial Infections* (2020): 57-73; Chen, Rui, et al., "A pan-cancer analysis reveals CLEC5A as a biomarker

for cancer immunity and prognosis” *Frontiers in Immunology* 13 (2022): 831542; y Wang, Quhui, et al., “CLEC5A promotes the proliferation of gastric cancer cells by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 524,3 (2020): 656-662; cada uno de los cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

Anticuerpos anti-CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno

La descripción proporciona anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a CLEC5A (p. ej., CLEC5A humano). Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente son capaces de unirse a CLEC5A. Estos anticuerpos pueden ser agonistas o antagonistas de la señalización mediada por CLEC5A. En algunas modalidades, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno pueden unirse a los dominios extracelulares de CLEC5A humana.

La descripción proporciona, p. ej., anticuerpos anti-CLEC5A 6A5, 6G9, 14A2, 5C7, 7G10, 3A7, 13E6, 9E11, los anticuerpos quiméricos de estos, y los anticuerpos humanizados de estos.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 3A7 y 3A7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 3, 5, 7, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 8-10, como se define por la definición de Kabat.

Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 4, 6, 7, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms, de
5 ident.: 8-10.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15, 17, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con
10 núms. de ident.: 18-20, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 14, 16, 17, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec.
15 con núms, de ident.: 18-20.

Las secuencias de CDR para anticuerpos derivados de 6A5 y 6A5 (p. ej., anticuerpos humanizados) incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núm. de ident.: 23, 25, 27, y las CDR del dominio variable de cadena
20 ligera, sec. con núm. de ident.: 28-30 como se define por la definición de Kabat. Las CDR también pueden definirse mediante la definición de Chothia. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establece en las sec. con núms. de ident.:
25 24, 26, 27 y las secuencias de CDR del dominio variable de

cadena ligera se establecen en las sec. con núm. de ident.: 28-30.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 6G9 y 6G9 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 33, 35, 37, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 38-40, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 34, 36, 37, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms, de ident.: 38-40.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 7G10 y 7G10 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 43, 45, 47, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 48-50, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 44, 46, 47, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms, de ident.: 48-50.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 9E11 y 9E11 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 53, 55, 57, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con

núms. de ident.: 58-60, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 54, 56, 57, y las CDR del
5 dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 58-60.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 13E6 y 13E6 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 63, 65, 67, y
10 las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 68-70, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 64, 66, 67, y las CDR del
15 dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 68-70.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 14A2 y 14A2 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 73, 75, 77, y
20 las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 78-80, como se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 74, 76, 77, y las CDR del
25 dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 78-80.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3A7 se establece en la sec. con núm. de ident.: 11. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 3A7 se establece en la sec. con núm. de ident.: 12.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 5C7 se establece en la sec. con núm. de ident.: 21. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5C7 se establece en la sec. con núm. de ident.: 22.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6A5 se establece en la sec. con núm. de ident.: 31. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 6A5 se establece en la sec. con núm. de ident.: 32.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6G9 se establece en la sec. con núm. de ident.: 41. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 6G9 se establece en la sec. con núm. de ident.: 42.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 7G10 se establece

en la sec. con núm. de ident.: 51. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 7G10 se establece en la sec. con núm. de ident.: 52.

5 La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 9E11 se establece en la sec. con núm. de ident.: 61. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 9E11 se establece en la sec. con núm. de ident.:

10 62.

 La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 13E6 se establece en la sec. con núm. de ident.: 71. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 13E6 se establece en la sec. con núm. de ident.: 72.

15 La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 14A2 se establece en la sec. con núm. de ident.: 81. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 14A2 se establece en la sec. con núm. de ident.: 82.

20 Porcentaje de humanización significa el porcentaje de identidad de la secuencia de región variable de cadena pesada o cadena ligera en comparación con las secuencias de anticuerpos humanos en la base de datos del

Sistema Internacional de Información de Inmunogenética (IMGT). En algunas modalidades, el porcentaje de humanización es mayor que 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 5 o 95 %. En la técnica se conoce una descripción detallada con respecto a cómo determinar el porcentaje de humanización y cómo determinar los mejores éxitos, y se describe, p. ej., en Jones, et al. "The INNs and outs of antibody nonproprietary names." MAbs. Vol. 8. núm. 1. Taylor 10 & Francis, 2016, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Un alto porcentaje de humanización a menudo tiene varias ventajas, p. ej., más seguro y más efectivo en humanos, más probabilidades de ser tolerado por un sujeto humano y/o menos probable de tener 15 efectos secundarios. En algunas modalidades, las regiones variables son completamente humanas, p. ej., derivadas de secuencias de locus de inmunoglobulina de cadena pesada humana (p. ej., recombinación de IGHV humano, IGHD humano e IGHJ humano) y/o secuencias de locus de inmunoglobulina 20 de cadena kappa humana (p. ej., recombinación de genes IGKV humano e IGKJ humano).

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3A7 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 83. La secuencia 25 de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del

anticuerpo 3A7 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 84.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 5C7 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 85. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 5C7 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 86.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6A5 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 87. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 6A5 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 88.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 7G10 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 89. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 7G10 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 90.

La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena pesada del anticuerpo 13E6 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 91. La secuencia de aminoácidos para la región variable de cadena ligera del anticuerpo 13E6 humanizado se establece en la sec. con núm. de ident.: 92.

También se proporcionan las secuencias de aminoácidos para regiones variables de cadena pesada y regiones variables ligeras de los anticuerpos modificados. En algunas modalidades, la región variable de cadena pesada es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 83, 85, 87, 89, y 91. En algunas modalidades, la región variable de cadena ligera es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 84, 86, 88, 90, y 92. La secuencia de región variable de cadena pesada puede emparejarse con la secuencia de región variable de cadena ligera correspondiente, y juntas se unen a CLEC5A.

Además, en algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente también pueden contener una, dos o tres CDR de región variable de cadena pesada seleccionadas del grupo de las sec. con núms. de ident.: 3, 5, 7, sec. con núms. de ident.: 4, 6, 7, sec. con núms. de ident.: 13, 15, 17, sec. con núms. de ident.: 14, 16, 17, sec. con núms. de ident.: 23, 25, 27, sec. con núms. de ident.: 24, 26, 27, sec. con núms. de ident.: 33, 35, 37, sec. con núms. de ident.: 34, 36, 37, sec. con núms. de ident.: 43, 45, 47, sec. con núms. de ident.: 44, 46, 47, sec. con núms. de

ident.: 53, 55, 57, sec. con núms. de ident.: 54, 56, 57,
sec. con núms. de ident.: 63, 65, 67, sec. con núms. de
ident.: 64, 66, 67, sec. con núms. de ident.: 73, 75, 77,
y sec. con núms. de ident.: 74, 76, 77; y/o una, dos o tres
5 CDR de región variable de cadena ligera seleccionadas del
grupo de sec. con núms. de ident.: 8-10, sec. con núms. de
ident.: 18-20, sec. con núms. de ident.: 28-30, sec. con
núms. de ident.: 38-40, sec. con núms. de ident.: 48-50,
sec. con núms. de ident.: 58-60, sec. con núms. de ident.:
10 68-70, y sec. con núms. de ident.: 78-80.

En algunas modalidades, los anticuerpos pueden
tener una región variable de cadena pesada (VH) que
comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR)
1, 2, 3, en donde la región CDR1 comprende o consiste en
15 una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %,
90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH CDR1
seleccionada, la región CDR2 comprende o consiste en una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %,
90 %, o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH
20 CDR2 seleccionada, y la región CDR3 comprende o consiste
en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %,
90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH CDR3
seleccionada. En algunas modalidades, el anticuerpo puede
tener una región variable de cadena ligera (VL) que
25 comprende las CDR 1, 2, 3, en donde la región CDR1 comprende
o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos

80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR1 seleccionada, la región CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR2 seleccionada y la región CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL CDR3 seleccionada. Las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VL seleccionadas se muestran en la Tabla 22.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 3 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 5 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 7 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 4 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 6

con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 7 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
5 fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
13 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 15
10 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 17 con cero, una
o dos inserciones, deleciones o sustituciones de
aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
15 fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
14 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 16
20 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 17 con cero, una
o dos inserciones, deleciones o sustituciones de
aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
25 fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
contener un dominio variable de cadena pesada que contiene

una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
23 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 25
con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
5 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 27 con cero, una
o dos inserciones de aminoácidos, deleciones, o
sustituciones.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
10 contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
24 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 26
con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
15 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 27 con cero, una
o dos inserciones de aminoácidos, deleciones, o
sustituciones.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
20 contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
33 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 35
con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
25 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 37 con cero, una

o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
5 contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 34 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 36 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
10 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 37 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
15 contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 43 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 45 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
20 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 47 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
25 contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:

44 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 46 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 47 con cero, una
5 o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
10 una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 53 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 55 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 57 con cero, una
15 o dos inserciones de aminoácidos, deleciones, o sustituciones.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene
20 una, dos o tres de las CDR de sec. con núm. de ident.: 54 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 56 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 57 con cero, una o
25 dos inserciones de aminoácidos, deleciones, o sustituciones.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
5 63 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 65 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 67 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de
10 aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
15 64 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 66 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 67 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de
20 aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:
25 73 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 75

con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 77 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena pesada que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 74 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
10 sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 76 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 77 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 8 con cero, una o dos inserciones, deleciones o
20 sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 9 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 10 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede

contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 18 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 19
5 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 20 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
10 fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 28 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 29
15 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 30 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un
20 fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 38 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 39
25 con cero, una o dos inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 40 con cero, una

o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
5 contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 48 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 49 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
10 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 50 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
15 contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 58 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 59 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones
20 de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 60 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede
25 contener un dominio variable de cadena ligera que contiene una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.:

68 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 69 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 70 con cero, una
5 o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

En algunas modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede contener un dominio variable de cadena ligera que contiene
10 una, dos o tres de las CDR de la sec. con núm. de ident.: 78 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 79 con cero, una o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos; sec. con núm. de ident.: 80 con cero, una
15 o dos inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

Las inserciones, deleciones y sustituciones pueden estar dentro de la secuencia CDR, o en uno o ambos extremos terminales de la secuencia CDR. En algunas
20 modalidades, la CDR se determina basada en la definición de Kabat. En algunas modalidades, la CDR se determina basada en la definición de Chothia. En algunas modalidades, la CDR se determina basada en una combinación de definición de Kabat y definición de Chothia.

25 La descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a

CLEC5A. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos contienen una región variable de cadena pesada (VH) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de VH seleccionada, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 12. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 31, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 32. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 41, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 42. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 51, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 52. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 61, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 62. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.:

71, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 72. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 81, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 82. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 84. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 87, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 88. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 89, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 90. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 91, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 92.

La descripción también proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos que pueden competir con los anticuerpos descritos en la presente. En algunos aspectos, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno pueden unirse al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en la presente.

La presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que

compite de forma cruzada con cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente. El ensayo de competencia cruzada es conocido en la técnica, y se describe p. ej., en Moore et al., “Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein.” Journal of virology 70,3 (1996): 1863-1872, que se incorpora como referencia en su totalidad). En un aspecto, la presente descripción también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este que se une al mismo epítipo o región que cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente. El ensayo de aglutinación de epítopos es conocido en la técnica, y se describe, p. ej., en Estep et al. “High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning.” MAbs. Vol. 5. No. 2. Taylor & Francis, 2013, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una cadena pesada de inmunoglobulina o una cadena ligera de inmunoglobulina. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina comprende CDR o tiene secuencias como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos se emparejan con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena

ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a CLEC5A (p. ej., CLEC5A humano).

Los anticuerpos anti-CLEC5A y los fragmentos de unión al antígeno también pueden ser variantes de anticuerpos (incluyendo derivados y conjugados) de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos adicionales proporcionados en la presente son anticuerpos policlonales, monoclonales, multiméricos, multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), humanizados, anticuerpos quiméricos (p. ej., quimera humano-ratón), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos producidos intracelularmente (es decir, intracuerpos) y fragmentos de unión al antígeno de estos. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, y IgA2), o subclase. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o fragmento de unión al antígeno de este.

Los fragmentos de anticuerpos son adecuados para su uso en los métodos proporcionados siempre que conserven la afinidad y especificidad deseadas del anticuerpo de longitud completa. Así, un fragmento de un anticuerpo que se une a CLEC5A conservará la capacidad de unirse a CLEC5A.

Un fragmento Fv es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión del antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno ligero en asociación estrecha, que
5 puede ser de naturaleza covalente, por ejemplo en scFv. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR o un subconjunto de las mismas confieren
10 especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) puede tener la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque generalmente con una afinidad menor que
15 todo el sitio de unión.

Los fragmentos de anticuerpo Fv o scFv monocatenario comprenden los dominios (o regiones) VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el
20 polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

El fragmento Fab contiene un dominio variable y
25 constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los

fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ comprenden un par de fragmentos Fab que generalmente están enlazados covalentemente cerca de sus terminales carboxi por cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen en la
5 técnica otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente descripción pueden modificarse en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas o vida media
10 sérica. En algunas modalidades, la región Fc puede modificarse para silenciar o disminuir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento
15 de unión al antígeno de este descrito en la presente reconoce un CLEC5A endógeno o un CLEC5A recombinante. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente reconoce el CLEC5A humano (p. ej., la región extracelular de la CLEC5A humano).

20

Anticuerpos multiespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos

En un aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que
25 comprenden: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno, en donde el primer

antígeno es un antígeno asociado a tumores (TAA); y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A). En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable de fragmentos (región Fc). En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este es un anticuerpo biespecífico.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A) se unen específicamente a un antígeno asociado a tumores (p. ej., HER2) y CLEC5A, y tales anticuerpos biespecíficos tienen regiones Fc modificadas o mejoradas (p. ej., una región Fc con las mutaciones GAALIE, mutaciones LALAPG, mutaciones S293D+I332E, mutaciones de botones en ojales (KIH) o afucosilación).

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada que comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera cadena ligera que comprende una primera región variable de cadena ligera (VL1); y una segunda cadena pesada que comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda cadena ligera que comprende una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

5 En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única (scFv) o VHH. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es un scFv o un VHH.

En algunas modalidades, el anticuerpo
10 multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende las mutaciones LALAPG: una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo
15 multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región
20 Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 25 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende las mutaciones GAALIE: una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración UE. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este tiene una afinidad de unión aumentada al receptor FcγRIIa y/o al receptor FcγRIIIa.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que está afucosilada. Los anticuerpos afucosilados se diseñan de manera que los oligosacáridos en la región Fc del anticuerpo no tengan ninguna unidad de azúcar fucosa. Cuando los anticuerpos están afucosilados, aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier formato adecuado. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento monocatenario

(scFv) que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) unido por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de
5 unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera del primer dominio de unión al antígeno a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, el
10 VH1 está vinculado a un dominio CH1, y el VL1 está enlazado a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C y la Figura 9F.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que
15 comprenden: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A). En algunas modalidades, el segundo dominio de
20 unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado a la cadena ligera del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al C-terminal de la
25 cadena ligera del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo

dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado a la cadena ligera del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este a través de un enlazador descrito en la presente. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA (p. ej., HER2). Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A). En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al C-terminal de la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al C-terminal de la región Fc del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este a través de un enlazador descrito en la presente. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA (p. ej., HER2).

Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9F.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que

5 comprenden: una primera cadena que comprende una primera cadena ligera y un primer scFv o VHH; una segunda cadena que comprende una primera cadena pesada; una tercera cadena que comprende una segunda cadena pesada; y una cuarta cadena que comprende una segunda cadena ligera y una segunda scFv

10 o VHH, en donde la primera cadena ligera y la segunda cadena ligera comprenden cada una una VL que tiene la misma secuencia (VL1), y la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden cada una una VH que tiene la misma secuencia (VH1). En algunas modalidades, el primer y

15 segundo scFv o VHH comprenden la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, cada uno del primer y segundo scFv o VHH comprende un VH2 y/o un VL2. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región Fc. En algunas modalidades,

20 la primera y segunda cadenas pesadas comprenden una región Fc. En algunas modalidades, la VH1 y VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el segundo

25 antígeno es CLEC5A. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden: una primera cadena que comprende una primera cadena ligera; una segunda cadena que comprende una primera

5 cadena pesada y un primer scFv o VHH; una tercera cadena que comprende una segunda cadena pesada y un segundo scFv o VHH; y una cuarta cadena que comprende una segunda cadena ligera, en donde la primera cadena ligera y la segunda

10 cadena ligera comprenden cada una una VL que tiene la misma secuencia (VL1), y la primera cadena pesada y la segunda cadena pesada comprenden cada una una VH que tiene la misma

secuencia (VH1). En algunas modalidades, el primer y segundo scFv o VHH comprenden la misma secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, cada uno del primer y

15 segundo scFv o VHH comprende un VH2 y/o un VL2. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región Fc. En algunas modalidades, la primera y segunda cadenas pesadas comprenden una región Fc. En algunas modalidades, el primer scFv o VHH está

20 enlazado al C-terminal de la región Fc de la primera cadena pesada. En algunas modalidades, el segundo scFv o VHH está enlazado al C-terminal de la región Fc de la segunda cadena pesada. En algunas modalidades, la VH1 y VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno

25 es un TAA. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el segundo

antígeno es CLEC5A. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9F.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que
5 comprenden: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A). En algunas modalidades, el segundo dominio de
10 unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A se une al N-terminal de la
15 región Fc del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A se une al N-terminal de la región Fc del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este a través de un enlazador descrito
20 en la presente. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA (p. ej., HER2). Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9D.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que
25 comprenden: una primera cadena que comprende una primera cadena ligera, en donde la primera cadena ligera comprende

una VL1; una segunda cadena que comprende una primera cadena pesada, en la que la primera cadena pesada comprende una región VH1 y una primera región Fc; y una tercera cadena que comprende un scFv o VHH, y una segunda región Fc. En algunas modalidades, el scFv o VHH comprende una VH2 y/o una VL2. En algunas modalidades, la primera región Fc comprende una o más mutaciones de botón, y la segunda región Fc incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera región Fc comprende una o más mutaciones de ojal, y la segunda región Fc incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, la VH1 y VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el segundo antígeno es CLEC5A. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9D.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno; un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un primer antígeno; y un tercer dominio de unión al antígeno que se une específicamente al miembro A de la familia 5 del dominio de lectina de tipo C (CLEC5A). En algunas modalidades, el tercer dominio de unión al antígeno que se

une específicamente a CLEC5A está enlazado al N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el tercer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A está enlazado al N-terminal de la región Fc del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A se une al N-terminal de la región Fc del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno de este a través de un enlazador descrito en la presente. En algunas modalidades, el primer antígeno y/o el segundo antígeno son TAA (p. ej., HER2). En algunas modalidades, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo TAA. En algunas modalidades, el primer antígeno y el segundo antígeno son TAA diferentes. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9B.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que comprenden: una primera cadena que comprende una primera cadena ligera, en donde la primera cadena ligera comprende una VL1 y una VL2; una segunda cadena que comprende una primera cadena pesada, en donde la primera cadena pesada comprende una región VH1, una VH2 y una primera región Fc; y una tercera cadena que comprende un scFv o VHH, y una segunda región Fc. En algunas modalidades, el scFv o VHH

comprende una VH3 y/o una VL3. En algunas modalidades, la primera región Fc comprende una o más mutaciones de botón, y la segunda región Fc incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera región Fc comprende una o más mutaciones de ojal, y la segunda región Fc incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, la VH1 y VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno y/o el segundo antígeno son TAA. En algunas modalidades, el VH3 y VL3 se unen a un tercer antígeno. En algunas modalidades, el tercer antígeno es CLEC5A. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9B.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una primera cadena pesada que comprende la VH1 y una primera cadena ligera que comprende la VL1; y una segunda cadena pesada que comprende la VH2 y una segunda cadena ligera que comprende la VL2. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A o la Figura 9E. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una

o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que

5 comprenden: una primera cadena que comprende una primera cadena ligera, en donde la primera cadena ligera comprende una VL1; una segunda cadena que comprende una primera cadena pesada, en la que la primera cadena pesada comprende una VH1; una tercera cadena que comprende una segunda cadena

10 pesada, en donde la segunda cadena pesada comprende una VH2; y una cuarta cadena que comprende una segunda cadena ligera, en donde la segunda cadena ligera comprende una VL2. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la VH1 y

15 VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno es un TAA. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el segundo antígeno es CLEC5A. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más

20 mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón.

También se proporcionan en la presente anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos, que

25 comprenden: una primera cadena que comprende una primera

cadena ligera, en donde la primera cadena ligera comprende una VL1; una segunda cadena que comprende una primera cadena pesada, en la que la primera cadena pesada comprende una VH1; una tercera cadena que comprende una segunda cadena pesada y un scFv o VHH, en donde la segunda cadena pesada comprende un VH2; y una cuarta cadena que comprende una segunda cadena ligera, en donde la segunda cadena ligera comprende una VL2. En algunas modalidades, el scFv o VHH comprende una VH3 y/o una VL3. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9E. En algunas modalidades, la VH1 y VL1 se unen a un primer antígeno. En algunas modalidades, la VH2 y VL2 se unen a un segundo antígeno. En algunas modalidades, el primer antígeno y/o el segundo antígeno son TAA. En algunas modalidades, el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo TAA. En algunas modalidades, el primer antígeno y el segundo antígeno son TAA diferentes. En algunas modalidades, el VH3 y VL3 se unen a un tercer antígeno. En algunas modalidades, el tercer antígeno es CLEC5A. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón.

En algunas modalidades, las sustituciones CrossMab se introducen en la primera cadena ligera y la

primera cadena pesada. En algunas modalidades, el dominio CH1 de la primera cadena pesada se reemplaza con la región constante de cadena ligera (CL) de la primera cadena ligera, y el CL de la primera cadena ligera se reemplaza con el
5 dominio CH1 de la primera cadena pesada.

En algunas modalidades, las sustituciones CrossMab se introducen en la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada. En algunas modalidades, el dominio CH1 de la segunda cadena pesada se reemplaza con la región
10 constante de cadena ligera (CL) de la segunda cadena ligera, y el CL de la segunda cadena ligera se reemplaza con el dominio CH1 de la segunda cadena pesada.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una secuencia de cadena pesada que
15 comprende una región Fc de IgG1 silvestre (sec. con núm. de ident.: 95). En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una región Fc que es aproximadamente o al menos
80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 20 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 95.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG1 con las mutaciones LALAPG
25 (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una secuencia de cadena

pesada que comprende una región Fc que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una región Fc de IgG1 con las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico tiene una
10 secuencia de cadena pesada que comprende una región Fc que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

La descripción proporciona anticuerpos anti-
15 TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A), los anticuerpos modificados de estos, que incluyen, p. ej., anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-
20 TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A), o fragmentos de anticuerpo de estos incluyen las combinaciones de dominios de unión al antígeno anti-HER2 y anti-CLEC5A mostrados en la Tabla 22.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) es un anticuerpo biespecífico.

Los anticuerpos biespecíficos pueden hacerse mediante ingeniería de la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, la interfaz puede contener al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Las “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a las cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Este método se describe, p. ej., en WO 96/27011, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Cualquiera de los anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente puede conjugarse con una molécula estabilizante (p. ej., una molécula que aumenta la vida media del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este en un sujeto o en solución). Los ejemplos no limitantes

de moléculas estabilizantes incluyen: un polímero (p. ej., un polietilenglicol) o una proteína (p. ej., albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana). La conjugación de una molécula estabilizante puede aumentar la vida media o extender la actividad biológica de un anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) o un fragmento de unión al antígeno in vitro (p. ej., en cultivo tisular o cuando se almacena como una composición farmacéutica) o in vivo (p. ej., en un ser humano).

Los anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) también pueden ser variantes de anticuerpos (que incluyen derivados y conjugados) de anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) o fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) adicionales (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) proporcionados en la presente son anticuerpos humanos policlonales, monoclonales, multiespecíficos (multiméricos, p. ej., biespecíficos), anticuerpos quiméricos (p. ej., quimera humano-ratón), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos producidos intracelularmente (es decir, intracuerpos) y fragmentos de unión al antígeno de estos. Los anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o subclase. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de IgG (p. 5 ej., la región Fc de IgG1 se muestra en la sec. con núm. de ident.: 95) o fragmento de unión al antígeno de este.

Los fragmentos de anticuerpos anti-TAA/CLEC5A multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) son adecuados para usar en los métodos 10 proporcionados siempre que conserven la afinidad y especificidad deseadas tanto para el TAA (p. ej., HER2) como para CLEC5A. Por lo tanto, un fragmento de un anticuerpo anti-TAA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) conservará la 15 capacidad de unirse a TAA (p. ej., HER2) y CLEC5A.

Antígenos asociados a tumores

Un antígeno asociado a tumores (TAA) es una sustancia antigénica producida en las células tumorales. 20 Puede desencadenar una respuesta inmune en el huésped. Los antígenos tumorales son marcadores tumorales útiles en la identificación de células tumorales con pruebas diagnósticas y son candidatos potenciales para usar en la terapia del cáncer. En la técnica se conocen numerosos 25 antígenos asociados a tumores (ver, p. ej., Yu et al., Cancers (Basel). 2023 Apr; 15(8): 2323; y Tong et al., Tong

et al., Mol Cancer, 2022 Nov 1;21(1):206, cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad).

En algunas modalidades, el TAA se selecciona del grupo que consiste en: HER2, CD79b, BCMA, CD38, GPRC5D, DLL3, CD70, GPC3, ligando de Fas (FasL), CD1d, glicolípidos de membrana, globotriaosilceramida (Gb3Cer/CD77), gangliósidos (GD2, GD3 y GM2), GPRC5D, CD34, CD45, antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR), CD123, CLL1, CD105, CD71, SSC, MAGE, MUC16, CD19, WT-1, B7H3, TEM8, CD22, LI-CAM, ROR-1, CEA, 4-1BB, ETA, 5T4, antígeno de adenocarcinoma, alfa-fetoproteína (AFP), BAFF, célula de linfoma B, antígeno CA242, CA-125, anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), C-MET, CCR4, CD133, CD152, CD20, CD125, CD200, CD221, CD23 (IgE receptor), CD28, CD30 (TNFRSF8), CD33, CD4, CD40, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD70, CD74, CD80, CEA, CNT0888, CTLA-4, DLL3, DR5, EGFR, EpCAM, CD3, FAP, dominio extra B de fibronectina, receptor de folato 1, GD2, gangliósido GD3, glicoproteína 75, GPNMB, HGF, receptor quinasa del factor de dispersión humano, receptor de IGF-1, IGF-I, IgG1, IL-5, IL-13, IL-6, IL-15, receptor del factor de crecimiento insulínico I, integrina $\alpha 5\beta 1$, integrina $\alpha v\beta 3$, MSLN, MS4A1, MUC1, mucina CanAg, ácido N-glicolilneuramínico, NPC-1C, PD-1, PD-L1, PDGF-R α , TWEAK, fosfatidilserina, células de carcinoma prostático, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, TAG-72, tenascina C, TGF beta 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-

R2, antígeno tumoral CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, OX40 y vimentina.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos, comprenden un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno asociado a tumores (TAA) y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno se une específicamente a HER2. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno se une específicamente a un TAA seleccionado de HER2, EGFR, EpCAM, CD79b, GPRC5D, BCMA, CD38, DLL3, CD70, GPC3, y mesotelina.

15 Anticuerpos anti-TAA/CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno de estos

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente tiene una actividad agonista sobre la activación de macrófagos. En algunas modalidades, la activación de macrófagos aumenta en aproximadamente o al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % tras el contacto con el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente, en comparación con la activación

de macrófagos sin contacto con dicho anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente que se une a macrófagos, está con las mutaciones LALAPG en la región Fc
5 (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente que se une a macrófagos, está con las mutaciones optimizadas en la región Fc (sec. con núm. de ident.: 97).

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente que se une a macrófagos, tiene mutaciones silenciosas (p. ej., mutaciones LALAPG) en la región Fc. En algunas modalidades,
15 el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente se une a células diana (p. ej., células cancerosas HER2+) con mutaciones silenciosas (p. ej., mutaciones LALAPG) en la región Fc.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente activa macrófagos (p. ej., a través del compromiso de CLEC5A), que median la destrucción de las células diana (p. ej., células cancerosas HER2+). En algunas modalidades, el anticuerpo
20 anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente activando macrófagos, es con mutaciones
25

silenciosas (p. ej., mutaciones LALAPG, sec. con núm. de ident.: 96) en la región Fc. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente incluye una región Fc de IgG1 humana silvestre. En algunas modalidades, el anti-TAA/CLEC5A (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente que se une a macrófagos, es con las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97) en la región Fc.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-TAA/CLEC5A (p. ej., biespecífico) multiespecífico (p. ej., anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente activa los macrófagos (p. ej., a través del compromiso de CLEC5A) e induce la destrucción de las células diana mediada por macrófagos. En algunas modalidades, la destrucción mediada por macrófagos da como resultado la destrucción de células diana (p. ej., células cancerosas HER2+). En algunas modalidades, aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más del número total de las células diana se matan a través de la fagocitosis mediada por macrófagos.

En algunas modalidades, el TAA descrito en la presente se selecciona de HER2, EGFR, EpCAM, CD79b, GPRC5D, BCMA, CD38, DLL3, CD70, GPC3, y mesotelina.

25

Anticuerpos anti-HER2/CLEC5A y fragmentos de unión al
antígeno de estos

El receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2 (HER2) es una proteína que en los humanos está codificada por el gen ERBB2. ERBB se abrevia del oncogén eritroblástico B, un gen originalmente aislado del genoma aviar. La proteína humana también se conoce frecuentemente como HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) o CD340 (grupo de diferenciación 340).

HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER/EGFR/ERBB). Pero contrariamente a otro miembro de la familia ERBB, HER2 no se une directamente al ligando. La activación de HER2 resulta de la heterodimerización con otro miembro ERBB o por homodimerización cuando la concentración de HER2 es alta, por ejemplo en el cáncer. Se ha demostrado que la amplificación o sobreexpresión de este oncogén juega un papel importante en el desarrollo y progresión de ciertos tipos agresivos de cáncer de mama. En los últimos años la proteína se ha convertido en un importante biomarcador y diana de la terapia para aproximadamente 30 % de las pacientes con cáncer de mama.

Pueden encontrarse revisiones detalladas de HER2, por ejemplo, en “ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI” en el sitio web del NCBI; “ERBB2”. Genetics Home Reference; Barh D, Gunduz M

(2015-01-22). Noninvasive Molecular Markers in Gynecologic Cancers. CRC Press. p. 427. ISBN 9781466569393; y Hsu JL, Hung MC (2016). "The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer". Cancer and Metastasis Reviews. 35 (4): 575-588. doi:10,1007/s10555-016-9649-6, el contenido completo de cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a HER2/CLEC5A (p. ej., HER2/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a HER2; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde

la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, y 3 de VL1 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 100, 102, y 104, respectivamente, y las secuencias de

aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 105, 106 y 107, respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 101, 103, y 104, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 105, 106 y 107, respectivamente;

la segunda región variable de cadena pesada (VH2) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera (VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia

de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

5 en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las
10 sec. con núms. de ident.: 3, 5, y 7, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente;

15 (2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 4, 6, y 7, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
20 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente;

(3) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las
25 sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2

seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente; y

5 (4) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3
de VH2 seleccionadas se establecen en las
sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
seleccionadas se establecen en las sec. con
10 núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de
aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
en las sec. con núms. de ident.: 100, 102, y 104,
15 respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR
1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms.
de ident.: 105, 106, y 107, respectivamente; las secuencias
de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
establecen en las sec. con núms. de ident.: 3, 5, y 7,
20 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1,
2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 8, 9, y 10, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de
aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
25 en las sec. con núms. de ident.: 101, 103, y 104,
respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR

1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 105, 106, y 107, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 4, 6, y 7, 5 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9, y 10, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen 10 en las sec. con núms. de ident.: 100, 102, y 104, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 105, 106, y 107, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se 15 establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen 20 en las sec. con núms. de ident.: 101, 103, y 104, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 105, 106, y 107, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se 25 establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17,

respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 108, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 109, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 11, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 108, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 109, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 83, y la segunda región variable de cadena ligera

comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 84.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 108, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 109, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 108, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 109, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera

comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende una
5 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde
10 la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 108, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 109.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH
15 seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL
20 seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 12;
- 25 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL

seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
22;

5 (3) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
84; y

(4) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 86, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
10 87.

En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1
CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2, y VL1 CDR3 que son
15 idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada
es la sec. con núm. de ident.: 108, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 109.

En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2
20 CDR1, VH2CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son
idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada
25 y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 12;
- 5 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22;
- 10 (3) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 84; y
- (4) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86, y la secuencia de VL
- 15 seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 87.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab. Trastuzumab (CAS 180288-
20 69-1, HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) es un anticuerpo monoclonal derivado del ADN recombinante, IgG1 kappa que es un formato humanizado de un anticuerpo anti-HER2 murino (4D5) que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células ($K_d=5$ nM) al dominio
25 extracelular de HER2 (ver, p. ej., las Patentes de los EE. UU. núms. 5.677.171; 5.821.337; 6.054.297; 6.165.464;

6.339.142; 6.407.213; 6.639.055; 6.719.971; 6.800.738;
7.074.404; Coussens et al (1985) Science 230:1132-9; Slamon
et al (1989) Science 244:707-12; Slamon et al (2001) New
Engl. J. Med. 344:783-792).

5 En algunas modalidades, el segundo dominio de
unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al
antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos
quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos
descritos en la presente. En algunas modalidades, el
10 segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión
al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7 o 3A7, los
anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos
humanizados de estos.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos
15 derivados de 3A7 y 3A7 incluyen CDR del dominio variable
de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 3, 5 y 7, y las
CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms.
de ident.: 8, 9 y 10, según se define por la definición de
Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR
20 del dominio variable de cadena pesada se establecen en las
sec. con núms, de ident.: 4, 6 y 7, y las CDR del dominio
variable de cadena ligera se establecen en las sec. con
núms, de ident.: 8, 9 y 10.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos
25 derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable
de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y

las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con
núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la
definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las
secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se
5 establecen en las sec. con núms, de ident.: 14, 16 y 17, y
las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen
en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno se une específicamente al HER2 humano,
10 de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de
unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano,
de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano
15 o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno
es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única
(scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio
20 de unión al antígeno es un scFv.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento
de unión al antígeno de este comprende una región
cristalizable de fragmentos (región Fc).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
25 HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito
en la presente está diseñado para tener una estructura de

subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para
5 tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la
10 sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en
15 la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %
20 idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un
25 ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A

multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio

variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera del primer dominio de unión al antígeno a través de un
5 segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada
10 a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena
15 pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más
20 mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A
25 multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la

presente puede tener una estructura mostrada en una cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 118. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 119.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “HER2/3A7 (2+2) Fc-LALAPG” o “HER2/3A7 (2+2 A) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 118; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 119.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 119.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 120. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 121.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “HER2/5C7 (2+2) Fc-LALAPG” o “HER2/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico al sec. con núm. de ident.: 120; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 121.

93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 121.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 122. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 123.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 122; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 123.

97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 123.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
5 una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 110.
En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye
10 una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
15 una primera secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 112.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
20 HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye tener una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 111.
25 En algunas modalidades, la segunda cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG

(sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
5 una segunda secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 113.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
10 HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “HER2/3A7 (1 +1 A) Fc-LALAPG” o “HER2/3A7 (1+1 A) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 110; y
15 una primera secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 112; y
20 una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 111; y
25 una segunda secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %,

89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 113.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

5 una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 114.

En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye

10 una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

15 una primera secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 116.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

20 una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 115.

25 En algunas modalidades, la segunda cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG

(sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
5 una segunda secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 117.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
10 HER2/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “HER2/5C7 (1 +1 A) Fc-LALAPG” o “HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 114; y
15 una primera secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 116; y
20 una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 115; y
25 una segunda secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %,

89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 117.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS)_n, (SG)_n, and (GGGGS)_n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-HER2/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-HER2/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos están emparejados con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de

cadena ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a HER2 y/o CLEC5A.

Anticuerpos anti-EGFR/CLEC5A y fragmentos de unión al

5 antígeno de estos

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; ErbB-1; HER1 en humanos) es una proteína transmembrana que es un receptor para miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF) de
10 ligandos de proteínas extracelulares. El receptor del factor de crecimiento epidérmico es un miembro de la familia de receptores ErbB, una subfamilia de cuatro receptores de tirosina quinasas estrechamente relacionados: EGFR (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) y Her 4 (ErbB-4), En
15 muchos tipos de cáncer, las mutaciones que afectan la expresión o actividad del EGFR podrían resultar en un cáncer más progresivo. La señalización deficiente del EGFR y otros receptores de tirosina quinasas en humanos se asocia con enfermedades como el Alzheimer, mientras que la
20 sobreexpresión se asocia con el desarrollo de una amplia variedad de tumores. La interrupción de la señalización de EGFR, ya sea bloqueando los sitios de unión de EGFR en el dominio extracelular del receptor o inhibiendo la actividad intracelular de la tirosina quinasa, puede prevenir el
25 crecimiento de tumores que expresan EGFR y mejorar la afección del paciente.

El EGFR es una proteína transmembrana que se activa mediante la unión de sus ligandos específicos, que incluyen el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformador α (TGFA). ErbB2 no tiene
5 ligando de activación directa conocido y puede estar en un estado activado constitutivamente o volverse activo tras la heterodimerización con otros miembros de la familia tales como EGFR. Tras la activación por sus ligandos del factor de crecimiento, EGFR sufre una transición de una
10 forma monomérica inactiva a un homodímero activo.

La dimerización del EGFR estimula su actividad intrínseca de proteína-tirosina quinasa intracelular. Como resultado, se produce la autofosforilación de varios residuos de tirosina (Y) en el dominio C-terminal del EGFR.
15 Estos incluyen Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173.

La autofosforilación produce la activación y señalización corriente abajo por varias otras proteínas que se asocian con las tirosinas fosforiladas a través de sus propios dominios SH2 de unión a fosfotirosina. Estas
20 proteínas de señalización corriente abajo inician varias cascadas de transducción de señales, principalmente las vías MAPK, Akt, y JNK, que conducen a la síntesis de ADN y la proliferación celular. Tales proteínas modulan fenotipos tales como la migración, la adhesión y la proliferación
25 celular. El dominio quinasa del EGFR también puede fosforilar de manera cruzada residuos de tirosina de otros

receptores con los que se agrega, y puede activarse él mismo de esa manera.

Las mutaciones que conducen a la sobreexpresión de EGFR (conocida como regulación positiva o amplificación) se han asociado con una serie de cánceres, que incluyen adenocarcinoma de pulmón (40 % de los casos), cánceres anales, glioblastoma (50 %) y tumores epiteliales de cabeza y cuello (80-100 %). Estas mutaciones somáticas que involucran EGFR conducen a su activación constante, lo que produce división celular incontrolada. En el glioblastoma se observa con frecuencia una mutación específica de EGFR, llamada EGFRvIII. Las mutaciones, amplificaciones o desregulaciones de EGFR o miembros de la familia están implicadas en aproximadamente 30 % de todos los cánceres epiteliales.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a EGFR/CLEC5A (p. ej., EGFR/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a EGFR; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno
5 comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde
10 la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la
15 región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1
20 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3
25 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %

idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR3
seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR
1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de
5 CDR 1, 2, y 3 de VL1 seleccionadas son una de las
siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,
2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.
con núms. de ident.: 126, 128, y 130,
10 respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
131, 132 y 133, respectivamente;

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,
15 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.
con núms. de ident.: 127, 129, y 130,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
20 131, 132 y 133, respectivamente;

(3) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3
de VH2 seleccionadas se establecen en las
sec. con núms. de ident.: 136, 138, y 140,
respectivamente, y las secuencias de
25 aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
seleccionadas se establecen en las sec. con

núms. de ident.: 141, 142 y 143,
respectivamente; y

5 (4) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3
de VH2 seleccionadas se establecen en las
sec. con núms. de ident.: 137, 139, y 140,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 141, 142 y 143,
10 respectivamente;

la segunda región variable de cadena pesada (VH2)
comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR)
1, 2 y 3, en donde la región VH2 CDR1 comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a
15 una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la
región VH2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que
es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos
VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a
20 una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera
(VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL2 CDR1
comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %
idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1
25 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia
de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia

de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

5 en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las
10 sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente; y
15

(2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las
sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de
20 aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de
25 aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 126, 128, y 130,

respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 131, 132, y 133, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 127, 129, y 130, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 131, 132, y 133, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 136, 138, y 140, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 141, 142, y 143, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se

95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es
5 al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 134, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 135, la segunda región variable de
10 cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
15 86.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 144, la primera región variable
20 de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 145, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera
25 comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es
5 al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 144, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 145, la segunda región variable de
10 cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
15 86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de
20 aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica la secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 134, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 135. En algunas modalidades,
25 la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de

ident.: 144, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 145.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y
- (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1 CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 134, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:

135. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 144, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 145.

5 En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2 CDR1, VH2CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
10 de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

(1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
15 22; y

(2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86.

20 En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-EGFR Cetuximab, Panitumumab, Necitumumab o Eg-B4-VHH. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del
25 anticuerpo anti-EGFR amivantamab (EGFR1). En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es el

dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-EGFR
nimotuzumab (EGFR2).

En algunas modalidades, el segundo dominio de
unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al
5 antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos
quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos
descritos en la presente. En algunas modalidades, el
segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión
al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, los anticuerpos
10 quiméricos de este y los anticuerpos humanizados de este.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos
derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable
de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y
CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms.
15 de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición
de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de
CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en
las sec. con núms, de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del
dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec.
20 con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno se une específicamente al EGFR humano,
de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de
unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano,
25 de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

5 En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un scFv.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable de fragmentos (región Fc).

 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de

15 subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en

20 la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la

25 sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un
5 ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.
15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico
20 descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
25 EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura

de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A tiene
5 una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos
10 biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio
15 variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera del primer dominio de unión al antígeno a través de un
20 segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta
25 configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede tener una estructura mostrada en cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 146 o 148. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 147 o 149.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “EGFR1/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 10 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident. 146; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de 15 ident.: 147. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “EGFR2/5C7 (2+2 A) FC-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 20 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 148; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de 25 ident.: 149.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se
5 conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS) n , (SG) n , and (GGGS) n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica
10 serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para
15 reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o
20 cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos se emparejan con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena
25 ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a EGFR y/o CLEC5A.

Anticuerpos anti-EpCAM/CLEC5A y fragmentos de unión al
antígeno de estos

La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)
5 -también conocida como transductor de señal de calcio
asociado a tumores 1 (TACST-1), 17-1A y CD326- es una
glicoproteína transmembrana de 40 kDa que se expresa
altamente en cánceres epiteliales, y a niveles más bajos
en epitelios simples normales. Se revisa la estructura y
10 función de EpCAM, por ejemplo, en Schnell et al., *Biochimica
et Biophysica Acta - Biomembranes* (2013), 1828 (8): 1989-
2001; Trzpis et al. *Am J Pathol.* (2007) 171(2): 386-395 and
Baeuerle y Gires, *Br. J. Cancer*, (2007) 96:417-423.

EpCAM se expresa en la membrana basolateral y
15 juega un papel en la adhesión celular homofílica
independiente del calcio. La molécula de EpCAM madura
(después del procesamiento para eliminar el péptido señal
de 23 aminoácidos) comprende un dominio extracelular N-
terminal de 242 aminoácidos que comprende una región de
20 repetición similar al factor de crecimiento epidérmico, una
región de repetición de tiroglobulina (TY) humana y una
región pobre en cisteína, un dominio transmembrana de 23
aminoácidos de paso único y un dominio citoplásmico C-
terminal de 26 aminoácidos que comprende dos sitios de unión
25 para a-actinina y un motivo de internalización NPXY. La
EpCAM se sobreexpresa frecuentemente en cánceres de origen

epitelial y se expresa por células madre cancerosas y por lo tanto es una molécula de interés significativo para la terapia y el diagnóstico. Debido a su frecuente y alta expresión en carcinomas y sus metástasis, EpCAM sirve como

5 marcador pronóstico, una diana terapéutica, y una molécula de anclaje en células tumorales circulantes y diseminadas (CTC/DTC), las cuales son consideradas la principal fuente de células cancerosas metastásicas. El dominio extracelular EpCAM puede escindirse para producir la molécula de dominio

10 extracelular soluble EpEX, y la molécula intracelular EpICD. Se ha demostrado que EpICD se asocia con otras proteínas para formar un complejo nuclear que regula positivamente la expresión de genes que promueven la proliferación celular. La EpCAM también puede estar

15 implicada en la transición celular epitelial a mesenquimal (EMT) y puede contribuir a la formación de metástasis grandes.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de

20 unión al antígeno de estos que se unen específicamente a EpCAM/CLEC5A (p. ej., EpCAM/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de

25 unión al antígeno que se une específicamente a EpCAM; y un

segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3

comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada,

5 en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, y 3 de VL1 seleccionadas son una de las siguientes:

10 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 150, 152, y 154, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 155, 156 y 157, respectivamente; y

15 (2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 151, 153, y 154, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 155, 156 y 157, respectivamente;

20 la segunda región variable de cadena pesada (VH2) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la
25 región VH2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a

una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera (VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las

sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
seleccionadas se establecen en las sec. con
5 núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3
de VH2 seleccionadas se establecen en las
sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17,
10 respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
seleccionadas se establecen en las sec. con
núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente.

15 En algunas modalidades, las secuencias de
aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
en las sec. con núms. de ident.: 150, 152, y 154,
respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR
1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms.
20 de ident.: 155, 156, y 157, respectivamente; las secuencias
de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17,
respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1,
2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con
25 núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 151, 153, y 154, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 155, 156, y 157, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 158, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 159, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es

al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 158, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 159, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 158, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 159.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde

la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

5 (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
 con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL
 seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
 22; y

 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
 con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
 seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
10 86.

 En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1
 CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
 CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
 VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son
15 idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de
 VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de
 VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 158, y la
 secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
 159.

20 En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2
 CDR1, VH2 CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
 CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
 VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son
 idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
25 de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada
 y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y
- 5 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-EpCAM Solitomab.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos descritos en la presente. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, los anticuerpos quiméricos de este y los anticuerpos humanizados de este.

20 Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de 25 CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en

las sec. con núms, de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de
5 unión al antígeno se une específicamente a EpCAM humano, de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano, de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de
10 unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única
15 (scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un scFv.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable de fragmentos (región Fc).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
20 EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En
25 algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la

presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc
5 comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
10 EpCAM/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una
15 secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito
20 en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la
25 presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EGFR/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera

del primer dominio de unión al antígeno a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede tener una estructura mostrada en una cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al

menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 160 o 162. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1
5 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al
10 menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 161 o 163.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se
15 denomina “EpCAM/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 160; y una secuencia de cadena
20 ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 161. En algunas modalidades, la secuencia de cadena pesada es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
25

162; y la secuencia de cadena ligera es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 163.

5 Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin
10 limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS)_n, (SG)_n, and (GGGS)_n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora
15 apropiada.

 En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto
20 entre las dos cadenas pesadas.

 La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-EpCAM/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-
25 EpCAM/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos se emparejan con el polipéptido

correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a EpCAM y/o CLEC5A.

5

Anticuerpos anti-GPRC5D/CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno de estos

El miembro D del grupo 5 de la familia C del receptor acoplado a proteína G (GPRC5D) es una proteína que
10 en humanos está codificada por el gen GPRC5D. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de
15 unión al antígeno de estos que se unen específicamente a GPRC5D/CLEC5A (p. ej., GPRC5D/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o
20 fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a GPRC5D; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de
25 cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno

comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones
5 determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a
10 una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera
15 (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende
20 una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de
25 aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, y 3 de VL1 seleccionadas son una de las siguientes:

- 5 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 164, 166, y 168, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
10 se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169, 170 y 171, respectivamente; y
- (2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 165, 167, y 168, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
15 se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169, 170 y 171, respectivamente;

la segunda región variable de cadena pesada (VH2)
20 comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que
25 es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una

secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera (VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la

5 región VL2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

10 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

15 en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3

20 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con

25 núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 164, 166, y 168, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169, 170, y 171, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 165, 167, y 168, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 169, 170, y 171, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se

establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

5 En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 172, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos
10 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera
15 comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

 En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es
20 al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 172, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 173, la segunda región variable de
25 cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm.

de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

5 En algunas modalidades, la VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica la secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 172, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 173.

15 En algunas modalidades, la VH2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde 20 la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

(1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y 25

(2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86.

5 En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1
CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son
idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de
10 VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de
VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 172, y la
secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
173.

 En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2
15 CDR1, VH2CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son
idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada
20 y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

(1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
22; y

25 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL

seleccionada es la sec. con núm. de ident.:

86.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos descritos en la presente. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, los anticuerpos quiméricos de este y los anticuerpos humanizados de este.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno se une específicamente al GPRC5D humano, de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano, de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

5 En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única (scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un scFv.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable de fragmentos (región Fc).

 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una
15 estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que
20 tiene una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de
25 ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un
5 ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración
15 EU. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo
20 multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico)
25 descrito en la presente puede diseñarse para tener una

estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A
5 tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos
10 biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio
15 variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera del primer dominio de unión al antígeno a través de un
20 segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta
25 configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede tener una estructura mostrada en una cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico)

incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 175.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “GPRC5D/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 10 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 174; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de 15 ident.: 175.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se 20 conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS)_n, (SG)_n, and (GGGS)_n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica 25 serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto
5 entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-GPRC5D/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-
10 GPRC5D/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos están emparejados con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena ligera correspondiente), los polipéptidos
15 emparejados se unen a GPRC5D y/o CLEC5A.

Anticuerpos anti-BCMA/CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno de estos

El antígeno de maduración de células B (BCMA o
20 BCM), también conocido como miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF17), es una proteína que en humanos es codificada por el gen TNFRSF17. El BCMA es un receptor de superficie celular de la superfamilia de receptores de TNF que reconoce el factor
25 activador de células B (BAFF). El antígeno de maduración de células B séricas (sBCMA) es la forma escindida de BCMA,

que se encuentra a niveles bajos en el suero de pacientes normales y generalmente elevada en pacientes con mieloma múltiple (MM).

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a BCMA/CLEC5A (p. ej., BCMA/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a BCMA; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a

una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

5 la primera región variable de cadena ligera (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1

10 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es

15 al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada,

 en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, y 3 de VL1

20 seleccionadas son una de las siguientes:

 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 176, 178, y 180, respectivamente, y las secuencias de

25 aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas

se establecen en las sec. con núms. de ident.:
181, 182 y 183, respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,
2, 3 seleccionadas se establecen en las sec.
5 con núms. de ident.: 177, 179, y 180,
respectivamente, y las secuencias de
aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas
se establecen en las sec. con núms. de ident.:
181, 182 y 183, respectivamente;

10 la segunda región variable de cadena pesada
(VH2) comprende regiones determinantes de
complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la
región VH2 CDR1 comprende una secuencia de
aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a
15 una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1
seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende
una secuencia de aminoácidos que es al menos
80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos
VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3
20 comprende una secuencia de aminoácidos que es
al menos 80 % idéntica a una secuencia de
aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera
(VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la
región VL2 CDR1 comprende una secuencia de
25 aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a

una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con

núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
5 en las sec. con núms. de ident.: 176, 178, y 180, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 181, 182, y 183, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
10 establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
15 en las sec. con núms. de ident.: 177, 179, y 180, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 181, 182, y 183, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
20 establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

25 En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es

al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec.

5 con núm. de ident.: 185, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 184, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 185, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

25 En algunas modalidades, la VH1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica la secuencia de VL seleccionada. En algunas
5 modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con
núm. de ident.: 184, y la secuencia de VL seleccionada es
la sec. con núm. de ident.: 185.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH
10 seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de
aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde
la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL
15 seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
22; y
- 20 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1
25 CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la

VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 184, y la
5 secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 185.

En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2 CDR1, VH2 CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
10 VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

(1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
15 con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y

(2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
20 seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos
25 quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos descritos en la presente. En algunas modalidades, el

segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, los anticuerpos quiméricos de este y los anticuerpos humanizados de este.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos
5 derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de
10 CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de
15 unión al antígeno se une específicamente al BCMA humano, de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano, de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de
20 unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única
25 (scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio de unión al antígeno es un scFv.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable de fragmentos (región Fc).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
5 BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej.,
10 biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia
15 de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para
20 tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos
25 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un

5 ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar

20 el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

25 El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos

biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de
5 fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera
10 del primer dominio de unión al antígeno a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada
15 a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena
20 pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más
25 mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera

cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la
5 presente puede tener una estructura mostrada en cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al
10 menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 186. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica
20 a la sec. con núm. de ident.: 187.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “BCMA/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos
25 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la

sec. con núm. de ident.: 186; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de
5 ident.: 187.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se
10 conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS) n , (SG) n , and (GGGS) n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica
15 serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para
20 reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o
25 cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-BCMA/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22.

Cuando los polipéptidos se emparejan con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a BCMA y/o CLEC5A.

Anticuerpos anti-CD38/CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno de estos

La CD38 (grupo de diferenciación 38), también conocida como ADP ribosa cíclica hidrolasa es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de muchas células inmunitarias (leucocitos), que incluyen CD4+, CD8+, linfocitos B y células asesinas naturales. CD38 también funciona en adhesión celular, transducción de señales y señalización de calcio. En humanos, la proteína CD38 está codificada por el gen CD38 que se encuentra en el cromosoma 4. CD38 es un parólogo de CD157, que también se encuentra en el cromosoma 4 (4p15) en humanos.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a CD38/CLEC5A (p. ej., CD38/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CD38; y un

segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada,

5 en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, y 3 de VL1 seleccionadas son una de las siguientes:

10 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 188, 190, y 192, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas

15 se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193, 194 y 195, respectivamente; y

(2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 189, 191, y 192, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas

20 se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193, 194 y 195, respectivamente;

la segunda región variable de cadena pesada (VH2) comprende regiones determinantes de

25 complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la

región VH2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

y la segunda región variable de cadena ligera (VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 seleccionadas son una de las siguientes:

- 5 (1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente; y
- 10 (2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con
- 15 núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 188, 190, y 192,

20 respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193, 194, y 195, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17,

25 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1,

2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
5 en las sec. con núms. de ident.: 189, 191, y 192, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 193, 194, y 195, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
10 establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, la primera región
15 variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec.
20 con núm. de ident.: 197, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
25 22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 196, la primera región variable
5 de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 197, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm.
10 de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, la VH1 comprende una
15 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada. En algunas
20 modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 196, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 197.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH
25 seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de

aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

5 (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y

 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86.

10

En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1 CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 196, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 197.

15

20

En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2 CDR1, VH2 CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia

25

de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

5 (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22; y

(2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 86.

10

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos

15 descritos en la presente. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, los anticuerpos quiméricos de este y los anticuerpos humanizados de este.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos

20 derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de

25 CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del

dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec.
con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno se une específicamente al CD38 humano,
5 de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de
unión al antígeno se une específicamente a CLEC5A humano,
de conejo, ratón, mono o perro.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno es un dominio de unión al antígeno humano
10 o humanizado; y/o el segundo dominio de unión al antígeno
es un dominio de unión al antígeno humano o humanizado.

En algunas modalidades, el primer dominio de
unión al antígeno es un fragmento variable de cadena única
(scFv, por sus siglas en inglés); y/o el segundo dominio
15 de unión al antígeno es un scFv.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento
de unión al antígeno de este comprende una región
cristalizable de fragmentos (región Fc).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
20 CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito
en la presente está diseñado para tener una estructura de
subtipo IgG1 con las mutaciones LALAPG (mutaciones L234A,
L235A y P329G en la numeración EU). En algunas modalidades,
el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej.,
25 biespecífico) descrito en la presente está diseñado para
tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en

la posición 234; una alanina (A) en la posición 235; y una glicina (G) en la posición 329 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región

Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
5 CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En
10 algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el
15 segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de
20 fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera
25 del primer dominio de unión al antígeno a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio

variable de cadena pesada del primer dominio de unión al antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede tener una estructura mostrada en una cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica

a la sec. con núm. de ident.: 198. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97).

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
5 CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 199.

10 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD38/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD38/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 15 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 198; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de 20 ident.: 199.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se 25 conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también

conocidos como enlazadores GS) tales como (GS)_n, (SG)_n, and (GGGS)_n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora
5 apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto
10 entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CD38/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-
15 CD38/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos están emparejados con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena ligera correspondiente), los polipéptidos
20 emparejados se unen a CD38 y/o CLEC5A.

Anticuerpos anti-CD79b/CLEC5A y fragmentos de unión al antígeno de estos

La molécula CD79b, beta asociada a
25 inmunoglobulina, también conocida como CD79B (Conjunto de Diferenciación 79B), es un gen humano. Se asocia con

agammaglobulinemia-6. El receptor del antígeno de linfocitos B es un complejo multimérico que incluye el componente específico del antígeno, la inmunoglobulina de superficie (Ig). La Ig superficial se asocia de manera no covalente con otras dos proteínas, Ig-alfa e Ig-beta, que son necesarias para la expresión y función del receptor del antígeno de células B. Este gen codifica la proteína Ig-beta del componente del antígeno de células B. Alternativamente, se han descrito variantes de transcripción empalmadas que codifican diferentes isoformas.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen específicamente a CD79b/CLEC5A (p. ej., CD79b/CLEC5A humano). En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este, que comprende: un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CD79b; y un segundo dominio de unión al antígeno que se une específicamente a CLEC5A.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno comprende una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1); y el segundo dominio de unión al antígeno

comprende una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2).

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada (VH1) comprende regiones
5 determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la región VH1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR1 seleccionada, la región VH1 CDR2 comprende una
10 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR2 seleccionada, y la región VH1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH1 CDR3 seleccionada; y

la primera región variable de cadena ligera
15 (VL1) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL1 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR1 seleccionada, la región VL1 CDR2 comprende
20 una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL1 CDR2 seleccionada, y la región VL1 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de
25 aminoácidos VL1 CDR3 seleccionada, en donde las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1,

2, 3 seleccionadas y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas son una de las siguientes:

- 5 (1) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 200, 202, y 204, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 10 205, 206 y 207, respectivamente; y
- (2) las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 201, 203, y 204, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 15 205, 206 y 207, respectivamente;
- la segunda región variable de cadena pesada (VH2) comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3, en donde la 20 región VH2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR1 seleccionada, la región VH2 CDR2 comprende 25 una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos

VH2 CDR2 seleccionada, y la región VH2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VH2 CDR3 seleccionada;

5 y la segunda región variable de cadena ligera (VL2) comprende CDR 1, 2 y 3, en donde la región VL2 CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR1

10 seleccionada, la región VL2 CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR2 seleccionada, y la región VL2 CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos que es

15 al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos VL2 CDR3 seleccionada,

en donde las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3 de VH2 seleccionadas, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2 y 3

20 seleccionadas son una de las siguientes:

(1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17, respectivamente, y las secuencias de

25 aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con

núms. de ident.: 18, 19 y 20,
respectivamente;

5

- (2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente;

10

15

- (1) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 3, 5, y 7, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente;

20

- (2) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 4, 6, y 7, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente;

25

- (5) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las

sec. con núms. de ident.: 63, 65, y 67,
 respectivamente, y las secuencias de
 aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
 seleccionadas se establecen en las sec. con
 5 núms. de ident.: 68, 69 y 70,
 respectivamente; y
 (6) las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3
 de VH2 seleccionadas se establecen en las
 sec. con núms. de ident.: 64, 66, y 67,
 10 respectivamente, y las secuencias de
 aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2
 seleccionadas se establecen en las sec. con
 núms. de ident.: 68, 69 y 70,
 respectivamente.
 15 En algunas modalidades, las secuencias de
 aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen
 en las sec. con núms. de ident.: 200, 202, y 204,
 respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR
 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms.
 20 de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias
 de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se
 establecen en las sec. con núms. de ident.: 13, 15, y 17,
 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1,
 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con
 25 núms. de ident.: 18, 19, y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 201, 203, y 204, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 14, 16, y 17, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 200, 202, y 204, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 3, 5, y 7, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9, y 10, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 201, 203, y 204, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR

1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 4, 6, y 7, 5 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen 10 en las sec. con núms. de ident.: 200, 202, y 204, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se 15 establecen en las sec. con núms. de ident.: 63, 65, and 67, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 68, 69, y 70, respectivamente.

En algunas modalidades, las secuencias de aminoácidos de VH1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen 20 en las sec. con núms. de ident.: 201, 203, y 204, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de VL1 CDR 1, 2, 3 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 205, 206, y 207, respectivamente; las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VH2 seleccionadas se 25 establecen en las sec. con núms. de ident.: 64, 66, y 67,

respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de CDR 1, 2, 3 de VL2 seleccionadas se establecen en las sec. con núms. de ident.: 68, 69 y 70, respectivamente.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 85, y la segunda región variable de cadena ligera

comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 86.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 11, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 12.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 83, y la segunda región variable de cadena ligera

comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 84.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 71, y la segunda región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 72.

En algunas modalidades, la primera región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 208, la primera región variable de cadena ligera comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 209, la segunda región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 91, y la segunda región variable de cadena ligera

comprende una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 92.

En algunas modalidades, la VH1 comprende una
5 secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH seleccionada, y la VL1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica la secuencia de VL seleccionada. En algunas
10 modalidades, la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 208, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 209.

En algunas modalidades, la VH2 comprende una
secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VH
15 seleccionada, y la VL2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada y la secuencia de VL
20 seleccionada son una de las siguientes:

- (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 22;
- 25 (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL

seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86;

5 (3) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
12;

10 (4) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
84;

(5) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 71, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
72; y

15 (6) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 91, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
92.

En algunas modalidades, la VH1 comprende VH1
20 CDR1, VH1 CDR2, y VH1 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL1 que comprende VL1 CDR1, VL1 CDR2 y VL1 CDR3 que son
idénticas a VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de una secuencia de
VL seleccionada. En algunas modalidades, la secuencia de
25 VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 208, y la

secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
209.

En algunas modalidades, la VH2 comprende VH2
CDR1, VH2 CDR2, y VH2 CDR3 que son idénticas a VH CDR1, VH
5 CDR2, y VH CDR3 de una secuencia de VH seleccionada; y la
VL2 que comprende VL2 CDR1, VL2 CDR2, y VL2 CDR3 que son
idénticas a VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3 de una secuencia
de VL seleccionada, en donde la secuencia de VH seleccionada
y la secuencia de VL seleccionada son una de las siguientes:

- 10 (1) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 21, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
22;
- (2) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
15 con núm. de ident.: 85, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
86;
- (3) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 11, y la secuencia de VL
20 seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
12;
- (4) la secuencia de VH seleccionada es la sec.
con núm. de ident.: 83, y la secuencia de VL
seleccionada es la sec. con núm. de ident.:
25 84;

- (5) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 71, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 72; y
- 5 (6) la secuencia de VH seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 91, y la secuencia de VL seleccionada es la sec. con núm. de ident.: 92.

En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es cualquiera del dominio de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CLEC5A, los anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos descritos en la presente. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno es el dominio de unión al antígeno del anticuerpo anti-CLEC5A 5C7, 3A7, 13E6, los anticuerpos quiméricos de estos y los anticuerpos humanizados de estos.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 5C7 y 5C7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 13, 15 y 17, y CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms, de ident.: 14, 16 y 17, y las CDR del

dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 18, 19 y 20.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 3A7 y 3A7 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 3, 5 y 7, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 4, 6 y 7, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 8, 9 y 10.

Las secuencias de CDR para los anticuerpos derivados de 13E6 y 13E6 incluyen CDR del dominio variable de cadena pesada, sec. con núms. de ident.: 63, 65 y 67, y las CDR del dominio variable de cadena ligera, sec. con núms. de ident.: 68, 69 y 70, según se define por la definición de Kabat. Bajo la definición de Chothia, las secuencias de CDR del dominio variable de cadena pesada se establecen en las sec. con núms. de ident.: 64, 66 y 67, y las CDR del dominio variable de cadena ligera se establecen en las sec. con núms. de ident.: 68, 69 y 70.

En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno se une específicamente al CD79b humano, de conejo, ratón, mono o perro; y/o el segundo dominio de

85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 96.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A descrito en la presente puede diseñarse para
5 tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos
10 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 97.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una región
15 Fc que comprende un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente está diseñado para tener una estructura de subtipo
20 IgG1 con las mutaciones S239D+I332E en la numeración EU. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico descrito en la presente está diseñado para tener una región Fc de IgG1 que tiene un ácido aspártico (D) en la posición 239 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la
25 numeración EU.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede diseñarse para tener una estructura de subtipo de IgG1 con mutaciones de botones en
5 ojales (KIH), que pueden promover la heterodimerización y evitar el mal emparejamiento entre las dos cadenas pesadas. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A tiene una tasa de endocitosis más alta que los anticuerpos monoclonales correspondientes o los anticuerpos
10 biespecíficos de control.

El primer fragmento de unión al antígeno y el segundo fragmento de unión al antígeno de los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente pueden estar en cualquier configuración
15 adecuada. En algunas modalidades, en donde el segundo dominio de unión al antígeno es un dominio variable de fragmento de cadena única (scFv) que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) y un dominio variable de cadena pesada (VH) enlazado por un primer enlazador.

20 En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno se une al C-terminal de la cadena ligera del primer dominio de unión al antígeno a través de un segundo enlazador. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada del primer dominio de unión al
25 antígeno se une a la región Fc. En algunas modalidades, la VH1 está enlazada a un dominio CH1, y la VL1 está enlazada

a un dominio CL. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9C. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente comprende una primera cadena pesada y una primera cadena ligera; y una segunda cadena pesada y una segunda cadena ligera. Una ilustración esquemática de esta configuración se muestra en la Figura 9A. En algunas modalidades, la región Fc comprende mutaciones de botones en ojales (KIH). En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal. En algunas modalidades, la primera cadena pesada incluye una o más mutaciones de ojal, y la segunda cadena pesada incluye una o más mutaciones de botón. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) descrito en la presente puede tener una estructura mostrada en una cualquiera de las Figuras 9A-9F.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210, y una segunda secuencia de cadena pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9A) que es

aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211. En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una primera secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 212, y una segunda secuencia de cadena ligera (mostrada como “L2” en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 213.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado” e incluye una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 210; una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 211.

94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la
sec. con núm. de ident.: 211; una primera secuencia de
cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %,
86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 5
96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm.
de ident.: 212; y una segunda secuencia de cadena ligera
que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.:
10 213.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1”
en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 15
85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con
núm. de ident.: 227, y una segunda secuencia de cadena
pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9A) que es
aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 20
89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 228.
En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas
pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las
mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En
25 algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A
multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una primera

secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 229, y una segunda secuencia de cadena ligera (mostrada como “L2” en la Figura 9A) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 230.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (1+1 A) Fc-optimizado” e incluye una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 227; una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 228; una primera secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 229; y una segunda secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %,

98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 230.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

5 una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 217, y una segunda secuencia de cadena

10 pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 218.

En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas

15 pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una

secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura

20 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 219.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-

25 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado” e incluye una

primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 217; una segunda
5 secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 218; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 219.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye
15 una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 234, y una segunda secuencia de cadena
20 pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 235.
En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas
25 pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En

algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9B) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 236.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-optimizado” e incluye una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 234; una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 235; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 236.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la Figura 9C) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 236.

86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 223. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones

5 LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura 9C) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 224.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se

15 denomina “CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 223; y una secuencia de cadena

20 ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 224.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-

25 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la

Figura 9C) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 240. En algunas modalidades, la cadena pesada

5 incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura

10 9C) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 241.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-

15 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la

20 sec. con núm. de ident.: 240; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 241.

25 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con

5 núm. de ident.: 214, y una segunda secuencia de cadena pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 215.

10 En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una

15 secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 216.

20 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado” e incluye una

25 primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 214; una segunda

secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 215; y una secuencia de cadena
5 ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 216.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
10 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con
15 núm. de ident.: 231, y una segunda secuencia de cadena pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 232.

20 En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una
25 secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9D) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 233.

87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 233.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
5 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado” e incluye una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %
10 idéntica a la sec. con núm. de ident.: 231; una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 232; y una secuencia de cadena
15 ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 233.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
20 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9E) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con
25 núm. de ident.: 220, y una segunda secuencia de cadena pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9E) que es

aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 221. En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura 9E) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 222.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado” e incluye una primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 220; una segunda secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 221; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 221.

97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 222.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

5 una primera secuencia de cadena pesada (mostrada como “H1” en la Figura 9E) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 237, y una segunda secuencia de cadena

10 pesada (mostrada como “H2” en la Figura 9E) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 238.

En algunas modalidades, la primera y/o segunda cadenas

15 pesadas incluyen una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una

secuencia de cadena ligera (mostrada como “L1” en la Figura

20 9E) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 239.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-

25 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado” e incluye una

primera secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 237; una segunda

5 secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 238; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 239.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye

15 una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 225. En algunas modalidades, la cadena pesada

20 incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura

25 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 225.

97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 226.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se
5 denomina “CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 225; y una secuencia de cadena
10 ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 226.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
15 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm.
20 de ident.: 244. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una
25 secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 245.

87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 245.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-
5 CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/3A7 (2+2 B) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la
10 sec. con núm. de ident.: 244; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 245.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm.
20 de ident.: 246. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones LALAPG (sec. con núm. de ident.: 96). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A
25 multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura

9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 247.

5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/13E6 (2+2 B) Fc-silenciado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 10 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 246; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de 15 ident.: 247.

 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una secuencia de cadena pesada (mostrada como “H” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 20 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 242. En algunas modalidades, la cadena pesada incluye una región Fc de IgG1 que comprende las mutaciones optimizadas (sec. con núm. de ident.: 97). En algunas 25 modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) incluye una

secuencia de cadena ligera (mostrada como “L” en la Figura 9F) que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 243.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A multiespecífico (p. ej., biespecífico) se denomina “CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado” e incluye una secuencia de cadena pesada que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 242; y una secuencia de cadena ligera que es aproximadamente o al menos 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 243.

Los enlazadores descritos en la presente pueden ser cualesquiera enlazadores adecuados conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el enlazador puede comprender una secuencia espaciadora. En la técnica se conocen diversas secuencias espaciadoras, que incluyen, sin limitación, espaciadores de glicina serina (GS) (también conocidos como enlazadores GS) tales como (GS)_n, (SG)_n, and (GGGS)_n (sec. con núm. de ident.: 99), donde n representa un número entero de al menos 1. Los expertos en la técnica

serían capaces de seleccionar la secuencia espaciadora apropiada.

En algunas modalidades, se introdujeron mutaciones de botón en ojal en las regiones Fc de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) para reducir la posibilidad de un emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas pesadas.

La descripción también proporciona ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A. La cadena pesada de inmunoglobulina o cadena ligera de inmunoglobulina en el anticuerpo anti-CD79b/CLEC5A comprende CDR como se muestra en la Tabla 22. Cuando los polipéptidos están emparejados con el polipéptido correspondiente (p. ej., una región variable de cadena pesada correspondiente o una región variable de cadena ligera correspondiente), los polipéptidos emparejados se unen a CD79b y/o CLEC5A.

Conjugados de fármacos de anticuerpos (ADC, por sus siglas en inglés)

Los anticuerpos, los fragmentos de unión al antígeno de estos, o los constructos de proteínas de unión al antígeno (p. ej., anticuerpos biespecíficos) descritos en la presente pueden conjugarse con un agente terapéutico (un fármaco). El agente terapéutico puede unirse covalentemente o no covalentemente al anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno o al constructo de proteína de unión al antígeno (p. ej., un anticuerpo biespecífico).

En algunas modalidades, el agente terapéutico es un agente citotóxico o citostático (p. ej., monometil auristatina E, monometil auristatina F, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, maitansinoides como DM-1 y DM-4, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina y ciclofosfamida y análogos. Las clases útiles de agentes citotóxicos, citostáticos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, ligantes del surco menor de ADN, inhibidores de la replicación del ADN y agentes alquilantes.

En algunas modalidades, el agente terapéutico puede incluir, pero sin limitación, reactivos citotóxicos, tales como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos y lo similar, agentes antivirales o agentes antimicrobianos. En algunas modalidades, el agente terapéutico a conjugar puede seleccionarse de, pero sin limitarse a, MMAE (monometil auristatina E), MMAD (monometil auristatina D) o MMAF (monometil auristatina F).

En algunas modalidades, el agente terapéutico es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como un derivado de dolastatin-10) o un derivado de esta. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetilbenzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de las auristatinas ilustrativas se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE. UU. núm. 2003-0083263; Publicación Internacional de Patente núm. WO 04/010957, Publicación de Patente Internacional núm. WO 02/088172, y Patente de los EE. UU. núms. 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414, cada uno de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad y a todos los efectos.

Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerígena. Las auristatinas se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre las células

cancerosas. Existen varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o un conjugado anticuerpo-fármaco resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico sobre una célula deseada.

En algunas modalidades, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos como aclacinomisinás, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina,

marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico,
 nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina,
 puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina,
 estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina,
 5 zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-
 fluorouracilo (5- FU); análogos de ácido fólico, tales como
 denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato;
 análogos de purina tales como fludarabina, 6-
 mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de
 10 pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-
 azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina,
 doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos
 tales como calusterona, propionato de dromostanolona,
 epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales
 15 tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;
 reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico;
 aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido
 aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno;
 edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona;
 20 elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de
 galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona;
 mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina;
 fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-
 etilhidrazida; procarbazona; PSK7; razoxano; sizofirán;
 25 espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2',2',2'-
 triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina;

manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; taxanos, p. ej., paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos, que incluyen por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Una descripción detallada de los agentes quimioterapéuticos puede encontrarse en, p. ej., US20180193477A1, que se incorpora por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el constructo de unión al antígeno se acopla al fármaco a través de un enlazador escindible, p. ej., un enlazador SPBD o un enlazador maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonilo (VC). En algunas modalidades, el constructo de unión al antígeno se acopla al fármaco a través de un enlazador no escindible, p. ej., un enlazador MCC formado usando SMCC o sulfo-SMCC. La selección de un enlazador apropiado para un ADC dado puede ser hecha fácilmente por el experto que tenga conocimiento de la técnica y teniendo en cuenta factores relevantes, tales como el sitio de unión al constructo de unión al antígeno, cualquier limitación estructural del fármaco y la hidrofobicidad del fármaco (ver, por ejemplo, la revisión en Nolting, Capítulo 5, Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, 2013, Ducry (Ed.), Springer). Se han descrito varias combinaciones específicas de enlazador-toxina y pueden usarse con los constructos de unión al antígeno descritos en la presente para preparar ADC en ciertas modalidades. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, enlazadores basados en péptidos escindibles con auristatinas tales como MMAE y MMAF, camptotecinas tales como SN-38, duocarmicinas y dímeros de PBD; enlazadores basados en MC no escindibles con auristatinas MMAF y MMAE; enlazadores basados en hidrazona lábiles al ácido con caliqueamicinas y doxorubicina; enlazadores basados en

disulfuro con maitansinoides tales como DM1 y DM4, y enlazadores basados en bis-maleimido-trioxietilenglicol (BMPEO) con maitansinoide DM1. Algunos de estos agentes terapéuticos y enlazadores se describen, p. ej., en Peters
5 & Brown, (2015) Biosci. Rep. e00225; Dosio et al., (2014) Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 9:35-65; Publicación de Patente de los EE. UU. núm. 2015/0374847 y US20180193477A1; que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

10 Dependiendo del fármaco deseado y del enlazador seleccionado, los expertos en la técnica pueden seleccionar un método adecuado para acoplarlos entre sí. Por ejemplo, algunos métodos de acoplamiento convencionales, tales como métodos de acoplamiento de amina, pueden usarse para formar
15 el complejo fármaco-enlazador deseado que todavía contiene grupos reactivos para conjugar con los anticuerpos a través del enlace covalente. En algunas modalidades, puede usarse un complejo fármaco-maleimida (es decir, fármaco enlazador de maleimida) para el grupo reactivo portador de carga útil
20 en la presente descripción. El grupo reactivo más común capaz de unir al grupo tiol en la preparación de ADC es la maleimida. Adicionalmente, los bromuros orgánicos, yoduros también se usan con frecuencia.

El ADC puede prepararse por una de varias vías
25 conocidas en la técnica, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los

expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press)). Por ejemplo, la conjugación puede lograrse mediante (1) la reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar el intermedio anticuerpo-enlazador Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con una porción D de fármaco activado; o (2) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de una porción de fármaco con un reactivo enlazador, para formar el intermedio D-L del fármaco enlazador, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un anticuerpo. Los métodos de conjugación (1) y (2) pueden emplearse con una variedad de anticuerpos, porciones de fármacos y enlazadores para preparar los ADC descritos aquí. Diversos enlazadores preparados, componentes enlazadores y toxinas están disponibles comercialmente o pueden prepararse usando técnicas estándar de química orgánica sintética. Estos métodos se describen, p. ej., en March's Advanced Organic Chemistry (Smith & March, 2006, Sixth Ed., Wiley); Toki et al., (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Frisch et al., (1997) Bioconj. Chem. 7:180-186; Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press); US20210379193A1, y US20180193477A1, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Además, también

están disponibles comercialmente varios enlazadores de fármacos preformados adecuados para la reacción con un constructo de unión al antígeno seleccionado, por ejemplo, las toxinas enlazadoras que comprenden DM1, DM4, MMAE, MMAF o Duocarmicina SA están disponibles en Creative BioLabs (Shirley, N.Y.).

En la técnica se conocen varios ejemplos específicos de métodos de preparación de ADC y se describen en la Patente de los EE. UU. núm. 8.624.003 (método pot.), Patente de los EE. UU. núm. 8.163.888 (una etapa), y patente de los EE. UU. núm. 5.208.020 (método de dos etapas), y US20180193477A1, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Otros métodos son conocidos en la técnica e incluyen los descritos en Antibody-Drug Conjugates: Methods in Molecular Biology, 2013, Ducry (Ed.), Springer.

La carga de fármaco está representada por el número de grupos de fármaco por anticuerpo en una molécula de ADC. Para algunos conjugados anticuerpo-fármaco, la carga de fármaco puede estar limitada por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en ciertas modalidades ilustrativas descritas en la presente, la carga de fármaco puede variar de 0 a 8 porciones de fármaco por anticuerpo. En ciertas modalidades, una mayor carga de fármaco, p. ej., $p \geq 5$, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o

pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados anticuerpo-fármaco. En ciertas modalidades, la carga media de fármaco para un conjugado anticuerpo-fármaco varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. De hecho, se ha demostrado que para ciertos conjugados anticuerpo-fármaco, la proporción óptima de porciones de fármaco por anticuerpo puede ser aproximadamente 4. En algunas modalidades, la relación fármaco a anticuerpo (DAR) es aproximadamente o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En otras modalidades, la DAR promedio en la composición es aproximadamente 1~ aproximadamente 2, aproximadamente 2~ aproximadamente 3, aproximadamente 3~ aproximadamente 4, aproximadamente 3~ aproximadamente 5, aproximadamente 4~ aproximadamente 5, aproximadamente 5~ aproximadamente 6, aproximadamente 6~ aproximadamente 7, o aproximadamente 7~ aproximadamente 8.

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos pueden tener diversas formas.

En general, los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas) pueden estar conformados por dos clases de cadenas polipeptídicas, cadenas ligeras y cadenas

pesadas. Un anticuerpo anti-HER2/CLEC5A no limitante de la presente descripción puede ser un anticuerpo intacto de cuatro cadenas de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada del anticuerpo anti-HER2/CLEC5A puede ser de cualquier isotipo que incluye IgM, IgG, IgE, IgA o IgD o subisotipo que incluye IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE1, IgE2, etc. La cadena ligera puede ser una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda.

10 Las regiones hipervariables, conocidas como regiones determinantes complementarias (CDR), forman bucles que comprenden la superficie principal de unión al antígeno del anticuerpo. Las cuatro regiones marco adoptan en gran medida una conformación de hoja beta y las CDR forman bucles

15 que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la hoja beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas muy cerca por regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del dominio de unión al antígeno.

20 Los métodos para identificar las regiones CDR de un anticuerpo mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo son bien conocidos, y se usan comúnmente varias definiciones de las CDR. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, y la

25 definición de Chothia se basa en la ubicación de las regiones del bucle estructural. Estos métodos y

definiciones se describen en, p. ej., Martin, "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains," Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan, et al. "Analysis and
5 improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains," Molecular immunology 45,14 (2008): 3832-3839; Wu, T.T. y Kabat, E.A. (1970) J. Exp. Med. 132: 211-250; Martin et al., Methods Enzymol. 203:121-53 (1991); Morea et al., Biophys Chem. 68(1-3):9-16 (Oct.
10 1997); Morea et al., J Mol Biol. 275(2):269-94 (Jan .1998); Chothia et al., Nature 342(6252):877-83 (Dec. 1989); Ponomarenko and Bourne, BMC Structural Biology 7:64 (2007); cada uno de los cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

15 Las CDR son importantes para reconocer un epítipo de un antígeno. Como se usa en la presente, un "epítipo" es la porción más pequeña de una molécula diana capaz de unirse específicamente por el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. El tamaño mínimo de un epítipo puede ser
20 aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos, pero estos aminoácidos no necesitan estar en una secuencia lineal consecutiva de la estructura primaria del antígeno, ya que el epítipo puede depender de la configuración tridimensional de un antígeno basada en la
25 estructura secundaria y terciaria del antígeno.

En algunas modalidades, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina intacta (p. ej., IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgD, IgE, IgA). Las subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4) están altamente conservadas, difieren en su región constante, particularmente en sus bisagras y dominios CH2 superiores. Las secuencias y diferencias de las subclases de IgG son conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Vidarsson, et al, “IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.” *Frontiers in immunology* 5 (2014); Irani, et al. “Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases.” *Molecular immunology* 67,2 (2015): 171-182; Shakib, Farouk, ed. *The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Elsevier, 2016; cada uno de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

El anticuerpo también puede ser una molécula de inmunoglobulina que se deriva de cualquier especie (p. ej., humano, roedor, ratón, rata o camélidos). El dominio de unión al antígeno o fragmento de unión al antígeno es una porción de un anticuerpo que retiene la actividad de unión específica del anticuerpo intacto, es decir, cualquier porción de un anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente a un epítipo en la molécula diana del

anticuerpo intacto. Incluye, p. ej., Fab, Fab', F(ab')₂, y variantes de estos fragmentos. Por lo tanto, en algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede comprender, p. ej., un scFv, un Fv, un Fd, 5 un dAb, un anticuerpo biespecífico, un scFv biespecífico, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, una molécula de anticuerpo monocadena, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo y cualquier polipéptido que incluya un dominio de unión que es, o sea 10 homólogo a, un dominio de unión a anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de dominios de unión al antígeno incluyen, p. ej., las CDR de cadena pesada y/o cadena ligera de un anticuerpo intacto, las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo intacto, cadenas pesadas o 15 ligeras de longitud completa de un anticuerpo intacto, o una CDR individual de la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo intacto.

En algunas modalidades, el scFv en un anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico) tiene dos dominios 20 variables de cadena pesada y dos dominios variables de cadena ligera. En algunas modalidades, el scFv tiene dos regiones de unión al antígeno (regiones de unión al antígeno: A y B), y las dos regiones de unión al antígeno pueden unirse a los antígenos diana respectivos con 25 diferentes afinidades.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden comprender una, dos o tres CDR de región variable de cadena pesada seleccionadas de la Tabla 22.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) descritos en la presente pueden conjugarse con un agente terapéutico. El conjugado anticuerpo-fármaco que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este puede unirse covalentemente o no covalentemente a un agente terapéutico. En algunas modalidades, el agente terapéutico es un agente citotóxico o citostático (p. ej., monometil auristatina E, monometil auristatina F, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, maitansinoides como DM-1 y DM-4, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, epirubicina y ciclofosfamida y análogos. En algunas modalidades, el agente terapéutico es MMAE o MMAF. En algunas modalidades, el agente terapéutico se conjuga a través de un enlazador, p. ej., un enlazador VC. Los detalles de los enlazadores usados para los ADC pueden encontrarse “p. ej., en Su, Z. et al. “Antibody-drug

conjugates: Recent advances in linker chemistry.” Acta Pharmaceutica Sinica B (2021), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

Los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.,
5 biespecíficos) pueden hacerse mediante ingeniería de la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, la interfaz puede contener al menos una parte del dominio CH3 de un
10 dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (p. ej., tirosina o triptófano). Las “cavidades” compensatorias de tamaño
15 idéntico o similar a las cadenas laterales grandes se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p. ej., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del
20 heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros. Este método se describe, p. ej., en WO 96/27011, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Cualquiera de los anticuerpos multiespecíficos
25 (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente puede conjugarse con una

molécula estabilizante (p. ej., una molécula que aumenta la vida media del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este en un sujeto o en solución). Los ejemplos no limitantes de moléculas estabilizantes incluyen: un
5 polímero (p. ej., un polietilenglicol) o una proteína (p. ej., albúmina sérica, tal como albúmina sérica humana). La conjugación de una molécula estabilizante puede aumentar la vida media o extender la actividad biológica de un anticuerpo anti-HER2/CLEC5A o un fragmento de unión al
10 antígeno in vitro (p. ej., en cultivo tisular o cuando se almacena como una composición farmacéutica) o in vivo (p. ej., en un ser humano).

Los anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos también pueden tener diversas
15 formas. Muchos formatos diferentes de anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión al antígeno de estos son conocidos en la técnica, y se describen, p. ej., en Suurs, et al. "A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges,"
20 Pharmacology & therapeutics (2019), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico es un BiTE, un (scFv)₂, un nanocuerpo, un nanocuerpo-HSA, un DART, un scDiacuerpo, a scDiacuerpo-CH₃,
25 scFv-CH-CL-scFv, a HSAbody, scDiacuerpo-HAS, o un tándem-scFv. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico

es un VHH-scAb, un VHH-Fab, un scFab dual, un $F(ab')_2$, un
 diacuerpo, un crossMab, un DAF (dos en uno), un DAF (cuatro
 en uno), un DutaMab, un DT-IgG, una cadena ligera común de
 botones en ojales, un ensamblaje de botones en ojales, un
 5 par de carga, un intercambio de brazo Fab, un SEEDbody, un
 LUZ-Y, un Fcab, un $\kappa\lambda$ -body, un Fab ortogonal, un DVD-IgG,
 un IgG(H)-scFv, un scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG,
 IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH
 IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody, DVI-IgG,
 10 Diacuerpo-CH3, un triple cuerpo, un minianticuerpo, un
 minicuerpo, un minicuerpo TriBi, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv,
 un $F(ab')_2$ -scFv2, un scFv-KIH, un Fab-scFv-Fc, un HCAb
 tetravalente, un scDiacuerpo-Fc, un Diacuerpo-Fc, un scFv-
 Fc en tándem, un Intracuerpo, un dock and lock, un lmmTAC,
 15 un conjugado IgG-IgG, un Cov-X-Body o un scFv1-PEG-scFv2.

En algunas modalidades, el anticuerpo
 biespecífico puede ser un TrioMab. En un TrioMab, las dos
 cadenas pesadas son de especies diferentes, en donde
 diferentes secuencias restringen el emparejamiento de
 20 cadenas pesadas-ligeras.

En algunas modalidades, el anticuerpo
 biespecífico tiene dos cadenas pesadas diferentes y una
 cadena ligera común. En algunas modalidades, el anticuerpo
 biespecífico tiene dos cadenas pesadas diferentes y dos
 25 cadenas ligeras diferentes. La heterodimerización de

cadenas pesadas puede basarse en los botones en ojales o alguna otra técnica de emparejamiento de cadenas pesadas.

En algunas modalidades, puede usarse la técnica CrossMab para producir anticuerpos biespecíficos. La

5 técnica CrossMab puede usarse para reforzar la asociación correcta de la cadena ligera en anticuerpos IgG heterodiméricos biespecíficos, esta técnica permite la generación de diversos formatos de anticuerpos biespecíficos, que incluyen anticuerpos biespecíficos bi-

10 (1+1), tri- (2+1) y tetra-(2+2) valentes, así como anticuerpos basados en fragmentos de unión al antígeno (Fab) en tándem no Fc. Estos formatos pueden derivarse de cualquier par de anticuerpos existente usando cruce de dominios, sin necesidad de la identificación de cadenas

15 ligeras comunes, procesamiento postraducciona/ensamblaje químico in vitro o la introducción de un conjunto de mutaciones que impongan una asociación correcta de la cadena ligera. El método se describe en Klein et al., “The use of CrossMAB technology for the generation of bi- and

20 multispecific antibodies.” mAbs. Vol. 8. núm. 6. Taylor & Francis, 2016, que se incorpora como referencia en su totalidad. En algunas modalidades, se intercambia el CH1 en la cadena pesada y el dominio CL en la cadena ligera.

El anticuerpo biespecífico puede ser un

25 Duocuerpo. El mecanismo de intercambio Fab que ocurre naturalmente en los anticuerpos IgG4 se imita en una materia

controlada en los anticuerpos IgG1, un mecanismo llamado intercambio Fab controlado. Este formato puede garantizar un emparejamiento específico entre las cadenas pesadas y ligeras.

5 En el anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), se añaden VH adicionales y dominio de cadena ligera variable (VL) a cada N-terminal para la orientación biespecífica. Este formato se asemeja al IgG-scFv, pero los dominios de unión añadidos se unen individualmente a sus
10 respectivos N-terminales en lugar de un scFv a cada N-terminal de la cadena pesada.

 En scFv-IgG, los dos scFv se conectan al C-terminal de la cadena pesada (CH3). El formato scFv-IgG tiene dos sitios de unión bivalentes diferentes y, en
15 consecuencia, también se denomina tetravalente. No hay ningún problema de emparejamiento de cadena pesada y cadena ligera en el scFv-IgG.

 En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede tener un formato IgG-IgG. Dos
20 anticuerpos IgG intactos se conjugan uniendo químicamente los terminales C de las cadenas pesadas.

 El anticuerpo biespecífico también puede tener un formato Fab-scFv-Fc. En el formato Fab-scFv-Fc, se ensamblan una cadena ligera, cadena pesada y una tercera
25 cadena que contiene la región Fc y el scFv. Puede asegurar una elaboración y purificación eficientes.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico puede ser un TF. Tres fragmentos Fab están enlazados por puentes disulfuro. Dos fragmentos se dirigen al antígeno asociado a tumores (TAA) y un fragmento se dirige a un hapteno. El formato TF no tiene una región Fc.

ADAPTIR tiene dos scFv unidos a cada lado de una región Fc. Abandona la IgG intacta como base para su constructo, pero conserva la región Fc para extender la vida media y facilitar la purificación.

El redireccionamiento de doble afinidad (DART, por sus siglas en inglés) tiene dos cadenas peptídicas que conectan los fragmentos opuestos, por lo tanto VLA con VHB y VLB con VHA, y un enlace de azufre en sus extremos C fusionándolos. En DART, el enlace de azufre puede mejorar la estabilidad sobre los BITE.

En DART-Fc, una región Fc está unida a la estructura DART. Puede generarse ensamblando tres cadenas, dos a través de un enlace disulfuro, como con el DART. Una cadena contiene la mitad de la región Fc que se dimerizará con la tercera cadena, expresando únicamente la región Fc. La adición de la región Fc mejora la vida media conduciendo a concentraciones efectivas más largas, evitando la IV continua.

En DART tetravalente, se ensamblan cuatro cadenas peptídica. Básicamente, se crean dos moléculas DART con la mitad de una región Fc y se dimerizarán. Este formato tiene

unión bivalente a ambas dianas, por lo que es una molécula tetravalente.

El diacuerpo en tándem (TandAb) comprende dos diacuerpos. Cada diacuerpo consiste en un fragmento VHA y VLB y un fragmento VHA y VLB que están asociados covalentemente. Los dos diacuerpos están enlazados con una cadena peptídica. Puede mejorar la estabilidad sobre el diacuerpo que consiste en dos scFv. Tiene dos sitios de unión bivalentes.

La toxina scFv-scFv incluye toxina y dos scFv con un enlazador estabilizante. Puede usarse para la entrega específica de carga útil.

En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico en la presente descripción está diseñado para ser 1+1 (monovalente para cada diana) y tiene una estructura de subtipo IgG1. Esto puede reducir la avidéz a las células con bajos niveles de expresión del primer y segundo epítomos, y aumentar la avidéz a las células que coexpresan el primer y segundo epítomos, para lograr una función de orientación mejorada.

En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen mutaciones KIH. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico incluye un primer brazo que comprende un primer dominio de unión al antígeno que se une específicamente al primer epítomo, y un segundo brazo que comprende un segundo dominio de unión al antígeno

que se une específicamente al segundo epítipo. En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno incluye una cadena pesada que incluye una o más mutaciones de botón (una cadena pesada de botón), y el segundo dominio de unión al antígeno incluye una cadena pesada que incluye una o más mutaciones de ojal (una cadena pesada de ojal). En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno incluye una cadena pesada que incluye una o más mutaciones de ojal (una cadena pesada de ojal), y el segundo dominio de unión al antígeno que incluye una cadena pesada que incluye una o más mutaciones de botón (una cadena pesada de botón).

Características de los anticuerpos

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos), o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden iniciar la destrucción de células diana (células tumorales) mediada por macrófagos, CDC o ADCC.

La descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) y fragmentos de unión al antígeno de estos que pueden unirse específicamente a un TAA (p. ej., HER2) y CLEC5A. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente pueden unirse a antígenos en células diana (p. ej., células que expresan TAA tales como

células HER2+) y reclutar células efectoras tales como macrófagos para la destrucción de las células diana.

Las técnicas generales pueden usarse para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen, p.
5 ej., ELISA, RIA y resonancia de plasmón superficial (SPR). Las afinidades pueden deducirse del cociente de las constantes de velocidad cinética ($KD=k_{off}/k_{on}$). En algunas implementaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden unirse al TAA con una tasa de
10 disociación (k_{off}) de menos de $0,1 \text{ s}^{-1}$, menos de $0,01 \text{ s}^{-1}$, menos de $0,001 \text{ s}^{-1}$, menos de $0,0001 \text{ s}^{-1}$, o menos de $0,00001 \text{ s}^{-1}$. En algunas modalidades, la tasa de disociación (k_{off}) es mayor que $0,01 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,001 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,0001 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,00001 \text{ s}^{-1}$, o mayor que $0,000001 \text{ s}^{-1}$.

15 En algunas modalidades, las tasas de asociación cinética (k_{on}) son mayores que $1 \times 10^2/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^3/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^4/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^5/\text{Ms}$, o mayores que $1 \times 10^6/\text{Ms}$. En algunas modalidades, las tasas de asociación cinética (k_{on}) son menores que $1 \times 10^5/\text{Ms}$,
20 menos de $1 \times 10^6/\text{Ms}$, o menos de $1 \times 10^7/\text{Ms}$.

En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden unirse al TAA con una KD de menos de $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, o menos de $1 \times 10^{-10} \text{ M}$. En algunas modalidades, la KD es menos de 50 nM, 40
25 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4

nM, 3 nM, 2 nM, o 1 nM. En algunas modalidades, KD es mayor que 1×10^{-7} M, mayor que 1×10^{-8} M, mayor que 1×10^{-9} M, o mayor que 1×10^{-10} M.

Los anticuerpos multiespecíficos (p. ej.,
5 biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos también pueden incluir un dominio de unión al antígeno que puede unirse específicamente a CLEC5A. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos descritos en la presente activan los
10 macrófagos y potencian la destrucción celular mediada por macrófagos (p. ej., la destrucción de células tumorales). En algunas modalidades, el anticuerpo puede reducir el volumen tumoral en un animal. En algunas modalidades, el anticuerpo puede reducir o ralentizar la progresión de una
15 enfermedad autoinmunitaria.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este descrito en la presente tiene una actividad agonista sobre la activación de macrófagos. En algunas modalidades, la activación de macrófagos se
20 incrementa en aproximadamente o al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con la activación de macrófagos sin el contacto con el anticuerpo o fragmento de unión al
25 antígeno de este descrito en la presente.

En algunas modalidades, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno de estos pueden unirse al TAA y/o CLEC5A con una tasa de disociación (k_{off}) de menos de $0,1 \text{ s}^{-1}$,
5 menos de $0,01 \text{ s}^{-1}$, menos de $0,001 \text{ s}^{-1}$, menos de $0,0001 \text{ s}^{-1}$, o menos de $0,00001 \text{ s}^{-1}$. En algunas modalidades, la tasa de disociación (k_{off}) es mayor que $0,01 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,001 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,0001 \text{ s}^{-1}$, mayor que $0,00001 \text{ s}^{-1}$, o mayor que $0,000001 \text{ s}^{-1}$.

10 En algunas modalidades, las tasas de asociación cinética (k_{on}) son mayores que $1 \times 10^2/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^3/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^4/\text{Ms}$, mayores que $1 \times 10^5/\text{Ms}$, o mayores que $1 \times 10^6/\text{Ms}$. En algunas modalidades, las tasas de asociación cinética (k_{on}) son menores que $1 \times 10^5/\text{Ms}$,
15 menos de $1 \times 10^6/\text{Ms}$, o menos de $1 \times 10^7/\text{Ms}$.

Las afinidades pueden deducirse del cociente de las constantes de velocidad cinética ($KD=k_{off}/k_{on}$). En algunas modalidades, KD es menor que $1 \times 10^{-6} \text{ M}$, menor que $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, menor que $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, menor que $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, o
20 menor que $1 \times 10^{-10} \text{ M}$. En algunas modalidades, la KD es menor que 50 nM , 40 nM , 30 nM , 20 nM , 15 nM , 10 nM , 9 nM , 8 nM , 7 nM , 6 nM , 5 nM , 4 nM , 3 nM , 2 nM , o 1 nM . En algunas modalidades, KD es mayor que $1 \times 10^{-7} \text{ M}$, mayor que $1 \times 10^{-8} \text{ M}$, mayor que $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, o mayor que $1 \times 10^{-10} \text{ M}$.

25 Debido a que el anticuerpo multiespecífico (p. ej., anticuerpo biespecífico) se une tanto al TAA como al

CLEC5A, para las células que expresan ambas moléculas, el anticuerpo tiene una mayor afinidad de unión a estas células. La avidéz Puede usarse para medir la afinidad de unión de un anticuerpo a estas células. La avidéz es la
5 fuerza acumulada de múltiples afinidades de interacciones de unión no covalentes individuales.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico), fragmento de unión al antígeno o ADC tiene una tasa o porcentaje de inhibición
10 del crecimiento tumoral (TGI %) que es mayor que 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, o 200 %. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico), fragmento de unión
15 al antígeno o ADC tiene un porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral que es menor que 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, o 150 %. La TGI (%) puede determinarse, p. ej., a 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,
20 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, o 41 días después de que comienza el tratamiento. Como se usa en la presente, la tasa o porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI %) se calcula usando la siguiente fórmula:

25

$$\text{TGI (\%)} = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100 \%$$

Ti es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento en el día i. T0 es el volumen tumoral promedio en el grupo de tratamiento en el día cero. Vi es el volumen tumoral promedio en el grupo control en el día i. V0 es el volumen tumoral promedio en el grupo control en el día cero.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico), fragmento de unión al antígeno o ADC tiene una región Fc funcional. En algunas modalidades, la función efectora de una región Fc funcional es la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas modalidades, la función efectora de una región Fc funcional es fagocitosis. En algunas modalidades, la función efectora de una región Fc funcional es ADCC y fagocitosis. En algunas modalidades, la región Fc es IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana o IgG4 humana.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico), fragmento de unión al antígeno o ADC no tiene una región Fc funcional. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de estos son fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv. En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmentos de unión al antígeno de este como se describe en la presente tienen una región Fc sin función efectora. En algunas modalidades, el Fc es un Fc

de IgG1 humana. En algunas modalidades, el Fc no tiene una región Fc funcional. Por ejemplo, la región Fc tiene mutaciones LALA (mutaciones L234A y L235A en numeración EU), o mutaciones LALAPG (mutaciones L234A, L235A, P329G en numeración EU). La secuencia de aminoácidos del mutante LALAPG de IgG1 humana se muestra en la sec. con núm. de ident.: 42.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico) o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región cristalizable del fragmento (región Fc). En algunas modalidades, el anticuerpo descrito en la presente puede diseñarse para tener una región Fc de IgG1 que tiene una alanina (A) en la posición 236, una leucina (L) en la posición 330 y un ácido glutámico (E) en la posición 332 en la numeración EU. En algunas modalidades, La región Fc comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente o al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 43.

Pueden hacerse algunas otras modificaciones a la región Fc. Por ejemplo, un residuo o residuos de cisteína pueden introducirse en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de un enlace disulfuro intercadena en esta región. La proteína de fusión homodimérica así generada puede tener cualquier vida media aumentada in vitro y/o in vivo.

En algunas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos multiespecíficas (p. ej., biespecíficas) que tienen una estructura de carbohidratos que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn297 (p. ej., estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) medida por espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los residuos de la región Fc; o posición 314 en la numeración Kabat); sin embargo, Asn297 también puede estar ubicado aproximadamente $\pm$ 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones menores de secuencia en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. En algunas modalidades, para reducir la heterogeneidad del glicano, la región Fc del anticuerpo puede diseñarse adicionalmente para reemplazar la asparagina en la posición 297 con alanina (N297A).

Vectores recombinantes

La presente descripción también proporciona vectores recombinantes (p. ej., vectores de expresión) que incluyen un polinucleótido aislado descrito en la presente

5 (p. ej., un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente), células huésped en las que se introducen los vectores recombinantes (es decir, de tal manera que las células huésped contengan el polinucleótido y/o un vector que comprende el polinucleótido), y la

10 producción de polipéptidos de anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de estos mediante técnicas recombinantes.

En algunas modalidades, el anticuerpo multiespecífico (p. ej., biespecífico) es un anti-

15 TAA/CLEC5A (p. ej., anticuerpo anti-HER2/CLEC5A). La secuencia de longitud completa de HER2 y/o CLEC5A humanos es conocida en la técnica. En algunas modalidades, una proteína HER2 y/o CLEC5A humana etiquetada con His se usa como inmunógeno.

20 Como se usa en la presente, un “vector” es cualquier constructo capaz de suministrar uno o más polinucleótido (s) de interés a una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped. Un “vector de expresión” es capaz de suministrar y expresar el uno o más

25 polinucleótido (s) de interés como un polipéptido codificado en una célula hospedadora en la que se ha

introducido el vector de expresión. Así, en un vector de expresión, el polinucleótido de interés se posiciona para la expresión en el vector al estar enlazado operativamente con elementos reguladores tales como un promotor, potenciador y/o una cola poli-A, ya sea dentro del vector o en el genoma de la célula huésped en o cerca o flanqueando el sitio de integración del polinucleótido de interés de manera que el polinucleótido de interés se traduzca en la célula huésped introducida con el vector de expresión.

10 Puede introducirse un vector en la célula huésped mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., electroporación, transfección química (p. ej., DEAE-dextrano), transformación, transfección e infección y/o transducción (p. ej., con virus recombinante). Por lo

15 tanto, los ejemplos no limitantes de vectores incluyen vectores virales (que pueden usarse para generar virus recombinantes), ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos, vectores de fagos y vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes condensadores catiónicos.

20 En algunas implementaciones, un polinucleótido descrito en la presente (p. ej., un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente) se introduce usando un sistema de expresión viral (p. ej., vaccinia u otro virus de la viruela, retrovirus o

25 adenovirus), que puede implicar el uso de un virus no patógeno (defectuoso), competente en replicación, o puede

usar un virus defectuoso de replicación. En este último caso, la propagación viral generalmente ocurrirá solo en células de empaquetamiento de virus complementarias. Los sistemas adecuados se dan a conocer, por ejemplo, en Fisher-
5 Hoch et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner et al., 1989, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexner et al., 1990, Vaccine, 8:17-21; patente de los EE. UU. núms. 4.603.112, 4.769.330, y 5.017.487; WO 89/01973; patente de los EE. UU. núm. 4.777.127; GB 2.200.651; EP
10 0.345.242; WO 91/02805; Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988; Rosenfeld et al., 1991, Science, 252:431-434; Kolls et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219; Kass-Eisler et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502; Guzman et al., 1993, Circulation, 88:2838-2848; y
15 Guzman et al., 1993, Cir. Res., 73:1202-1207. Las técnicas para incorporar ADN en tales sistemas de expresión son bien conocidas por los conocimientos ordinarios en la materia. El ADN también puede estar “desnudo”, como se describe, por ejemplo, en Ulmer et al., 1993, Science, 259:1745-1749, and
20 Cohen, 1993, Science, 259:1691-1692. La captación de ADN desnudo puede aumentarse recubriendo el ADN sobre perlas biodegradables que se transportan eficientemente a las células.

Para la expresión, el inserto de ADN que comprende
25 un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente puede estar enlazado operativamente a un

promotor apropiado (p. ej., un promotor heterólogo), tal como el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp y tac de E. coli, los promotores tempranos y tardíos SV40 y promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. El

5 experto en la técnica conoce otros promotores adecuados. Los constructos de expresión pueden contener además sitios para el inicio, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificadora de las transcripciones

10 maduras expresadas por los constructos puede incluir una traducción que se inicia al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) posicionado apropiadamente al final del polipéptido a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión pueden

15 incluir al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para el cultivo de células eucariotas y los genes de resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina para el cultivo en E. coli y otras bacterias. Los ejemplos

20 representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como células de E. coli, Streptomyces y Salmonella typhimurium; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insectos tales como células de Drosophila S2 y Spodoptera

25 Sf9; células animales tales como CHO, COS, melanoma de Bowes y células HK 293; y células vegetales. Los medios de cultivo

y las condiciones apropiados para las células huésped descritas en la presente son conocidos en la técnica.

Los vectores no limitantes para su uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en
5 Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5
10 disponibles en Pharmacia. Los vectores eucariotas no limitantes incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Los promotores bacterianos no limitantes adecuados para usar incluyen los promotores lacI y lacZ de
15 E. coli, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores lambda PR y PL y el promotor trp. Los promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor de timidina quinasa del HSV, los promotores tempranos y tardíos de SV40, los promotores
20 de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína-I de ratón.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden
25 usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol

oxidasa y PGH. Para las revisiones, ver Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, and Grant et al., Methods Enzymol., 153: 516-544 (1997).

5 La introducción del constructo en la célula huésped puede verse afectada por transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos.

10 Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986), que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

 La transcripción del ADN que codifica un

15 anticuerpo de la presente descripción por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia del potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, generalmente aproximadamente de 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad

20 transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador SV40, que se encuentra en el lado tardío del origen de replicación en los pares de bases 100 a 270, el potenciador temprano del promotor del citomegalovirus, el potenciador

25 del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el medio extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Las señales
5 pueden ser endógenas al polipéptido, o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión (p. ej., una fusión GST) o con una etiqueta de histidina, y puede incluir
10 no solo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en
15 la célula huésped, durante la purificación, o durante la manipulación y almacenamiento posteriores. También, pueden añadirse grupos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Tales regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de
20 porciones peptídicas a polipéptidos para engendrar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otras, son técnicas familiares y rutinarias en la técnica.

La descripción también proporciona una secuencia
25 de ácido nucleico que es al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en la presente, y una secuencia de aminoácidos que es al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a cualquier secuencia de aminoácidos como se describe en la presente.

10 La descripción también proporciona una secuencia de ácido nucleico que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 15 97 %, 98 %, 99 % a cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en la presente, y una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 20 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % a cualquier secuencia de aminoácidos como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la descripción se relaciona con secuencias de nucleótidos que codifican cualquier péptido que se describe en la presente, o 25 cualquier secuencia de aminoácidos que esté codificada por

cualquier secuencia de nucleótidos como se describe en la presente. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico es menor que 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, o 5 600 nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos es menor que 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, o 400 residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, la secuencia de 10 aminoácidos (i) comprende una secuencia de aminoácidos; o (ii) consiste en una secuencia de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos es una cualquiera de las secuencias como se describe en la presente.

En algunas modalidades, la secuencia de ácido 15 nucleico (i) comprende una secuencia de ácido nucleico; o (ii) consiste en una secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de ácido nucleico es una cualquiera de las secuencias como se describe en la presente.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos 20 secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (p. ej., pueden introducirse brechas en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima 25 y las secuencias no homólogas pueden ser ignoradas para fines de comparación). A continuación, se comparan los

residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la

5 posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente la “identidad” de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a la “homología” de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos

10 secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas y la longitud de cada brecha, que se deben introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. Por ejemplo, la comparación de secuencias

15 y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de brecha de 12, una penalización de extensión de brecha de 4 y una penalización de brecha de cambio de marco de 5.

20 La descripción proporciona uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los polipéptidos como se describe en la presente. En algunas modalidades, el ácido nucleico (p. ej., ADNc) incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de una cadena pesada como se

25 describe en la presente. En algunas modalidades, el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un

polipéptido de una cadena ligera como se describe en la presente. En algunas modalidades, el ácido nucleico incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido scFv como se describe en la presente.

5 En algunas modalidades, el vector puede tener dos de los ácidos nucleicos como se describe en la presente, en donde el vector codifica la región VL y la región VH que se unen juntas al TAA (p. ej., HER2). En algunas modalidades, se proporciona un par de vectores, en donde
10 cada vector comprende uno de los ácidos nucleicos como se describe en la presente, en donde juntos el par de vectores codifica la región VL y la región VH que se unen juntas al TAA (p. ej., HER2).

 En algunas modalidades, el vector incluye dos de
15 los ácidos nucleicos como se describe en la presente, en donde el vector codifica la región VL y la región VH que juntas se unen a CLEC5A. En algunas modalidades, se proporciona un par de vectores, en donde cada vector comprende uno de los ácidos nucleicos como se describe en
20 la presente, en donde juntos el par de vectores codifica la región VL y la región VH que juntas se unen a CLEC5A.

Métodos de tratamiento

 Los métodos descritos en la presente incluyen
25 métodos para el tratamiento de trastornos asociados con el cáncer. Generalmente, los métodos incluyen administrar una

cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A) como se describe en la presente, a un sujeto
5 que lo necesita, o que se ha determinado que necesita, tal tratamiento.

Tal como se usa en este contexto, “tratar” significa mejorar al menos un síntoma del trastorno asociado al cáncer. Con frecuencia, el cáncer resulta en
10 la destrucción; por lo tanto, un tratamiento puede resultar en un aumento de la esperanza de vida (p. ej., en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años). La administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente
15 descrito en la presente para el tratamiento de una afección asociada con el cáncer dará como resultado una disminución del número de células cancerosas y/o síntomas aliviados.

Como se usa en la presente, el término “cáncer” se relaciona con células que tienen la capacidad de
20 crecimiento autónomo, es decir, un estado anormal o afección caracterizada por un crecimiento celular que prolifera rápidamente. El término pretende incluir todo tipo de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos
25 transformados a malignidad, independientemente del tipo histopatológico o etapa de invasividad. El término “tumor”

tal como se usa en la presente se relaciona con células cancerosas, p. ej., una masa de células cancerosas. Los cánceres que pueden tratarse o diagnosticarse usando los métodos descritos en la presente incluyen neoplasias

5 malignas de los diversos sistemas de órganos, tales como afectar pulmón, mama, tiroides, linfoide, gastrointestinal, y del tracto genito-urinario, así como adenocarcinomas que incluyen neoplasias malignas como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de

10 próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del intestino delgado y cáncer de esófago. En algunas modalidades, los agentes descritos en la presente están diseñados para tratar o diagnosticar un carcinoma en un sujeto. El término “carcinoma” es

15 reconocido en la técnica y se relaciona con neoplasias malignas de tejidos epiteliales o endocrinos que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas

20 prostáticos, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. En algunas modalidades, el cáncer es carcinoma renal o melanoma. Los carcinomas ilustrativos incluyen los que se forman a partir de tejido del cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término

25 también incluye carcinosarcomas, p. ej., que incluyen tumores malignos compuestos por tejidos carcinomatosos y

sarcomatosos. Un “adenocarcinoma” se relaciona con un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. El término “sarcoma” es reconocido en la técnica y se relaciona con tumores malignos de derivación mesenquimatosa.

En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer resistente a quimioterapia.

En un aspecto, la descripción también proporciona métodos para tratar un cáncer en un sujeto, métodos para reducir la tasa del aumento de volumen de un tumor en un sujeto a lo largo del tiempo, métodos para reducir el riesgo de desarrollar una metástasis, o métodos para reducir el riesgo de desarrollar una metástasis adicional en un sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento puede detener, ralentizar, retardar o inhibir la progresión de un cáncer. En algunas modalidades, el tratamiento puede resultar en la reducción del número, gravedad y/o duración de uno o más síntomas del cáncer en un sujeto.

En un aspecto, la descripción presenta métodos que incluyen administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) como se describe en la presente a un sujeto que lo necesita, p. ej., un sujeto que tiene,

o se ha identificado o diagnosticado como que tiene, un
cáncer, p. ej., linfoma de células B, cáncer de vejiga,
cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer
gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP),
5 mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer
de próstata, cáncer oral o cáncer renal. En algunas
modalidades, el cáncer es un tumor sólido tal como cáncer
de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer
de tiroides, cáncer del sistema nervioso central (SNC),
10 cáncer de hígado o cáncer cerebral.

Como se usa en la presente, los términos “sujeto”
y “paciente” se usan indistintamente a lo largo de la
especificación y describen un animal, humano o no humano,
a quien se proporciona tratamiento de acuerdo con los
15 métodos de la presente invención. Las aplicaciones
veterinarias y no veterinarias están contempladas por la
presente invención. Los pacientes humanos pueden ser
humanos adultos o humanos juveniles (p. ej., humanos
menores de 18 años). Además de los humanos, los pacientes
20 incluyen pero no se limitan a ratones, ratas, hámster,
cobayos, conejos, hurones, gatos, perros y primates. Se
incluyen, por ejemplo, primates no humanos (p. ej., mono,
chimpancé, gorila y lo similar), roedores (p. ej., ratas,
ratones, gerbos, hámster, hurones, conejos), lagomorfos,
25 cerdos (p. ej., cerdo, cerdo miniatura), equinos, caninos,

felinos, bovinos y otros animales domésticos, de granja y de zoológico.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente pueden usarse para el
5 tratamiento de pacientes en riesgo de un cáncer. Los pacientes con cáncer pueden identificarse con diversos métodos conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente, por una “cantidad efectiva” se entiende una cantidad o dosificación
10 suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados que incluyen detener, ralentizar, retardar o inhibir la progresión de una enfermedad, p. ej., un cáncer. Una cantidad efectiva variará dependiendo de, p. ej., una edad y un peso corporal de un sujeto al que el anticuerpo,
15 fragmento de unión al antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco, polinucleótido que codifica anticuerpo (p. ej., anticuerpo anti-TAA/CLEC5A tal como anticuerpo anti-HER2/CLEC5A, fragmento de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A, polinucleótido que codifica anticuerpo anti-
20 HER2/CLEC5A), vector que comprende el polinucleótido y/o composiciones de este se va a administrar, una gravedad de los síntomas y una vía de administración, y de esta manera la administración puede determinarse de manera individual.

Puede administrarse una cantidad efectiva en una
25 o más administraciones. A manera de ejemplo, una cantidad efectiva del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno

(p. ej., anticuerpo anti-TAA/CLEC5A tal como anticuerpo anti-HER2/CLEC5A, fragmento de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A) es una cantidad suficiente para mejorar, detener, estabilizar, revertir, inhibir, ralentizar y/o retrasar la progresión de una enfermedad autoinmunitaria o un cáncer en un paciente o es una cantidad suficiente para mejorar, detener, estabilizar, revertir, ralentizar, y/o retrasar la proliferación de una célula (p. ej., una célula sometida a biopsia, cualquiera de las células cancerosas descritas en la presente, o línea celular (p. ej., una línea celular cancerosa)) in vitro.

Las cantidades y programas efectivos para administrar el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco y/o composiciones descritas en la presente pueden determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la técnica. Los expertos en la técnica entenderán que la dosificación que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, conjugados anticuerpo-fármaco y/o composiciones descritas en la presente, la vía de administración, el tipo particular del agente o composiciones descritas en la presente usadas y otros fármacos que se administran al mamífero.

Una dosificación diaria típica de una cantidad efectiva del anticuerpo, fragmento de unión al antígeno,

conjugados anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpo anti-TAA/CLEC5A tal como anticuerpo anti-HER2/CLEC5A, fragmento de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A, conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) es 0,01 mg/kg a 100 mg/kg. En algunas modalidades, la dosificación puede ser menor que 100 mg/kg, 30 mg/kg, 20 mg/kg, 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, o 0,1 mg/kg. En algunas modalidades, la dosificación puede ser mayor que 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,05 mg/kg, o 0,01 mg/kg. En algunas modalidades, la dosificación es de aproximadamente o al menos 10 mg/kg, 9 mg/kg, 8 mg/kg, 7 mg/kg, 6 mg/kg, 5 mg/kg, 4 mg/kg, 3 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg, 0,9 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,2 mg/kg, o 0,1 mg/kg.

En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse al sujeto. El agente terapéutico adicional puede ser un inhibidor de un TAA. El agente terapéutico adicional puede comprender uno o más inhibidores seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de B-Raf, un inhibidor de HER2, un inhibidor de una MEK, un inhibidor de ERK, un inhibidor de K-Ras, un inhibidor de c-Met, un inhibidor de CLEC5A, un inhibidor de linfoma de quinasa anaplásico (ALK), un inhibidor de una

fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), un inhibidor de un Akt, un inhibidor de mTOR, un inhibidor dual de PI3K/mTOR, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) y un inhibidor de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y/o
5 isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2). En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indoleamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO1) (p. ej., epacadostat).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más inhibidores
10 seleccionados del grupo que consiste en un inhibidor de HER2, un inhibidor de CLEC5A, un inhibidor de LSD1, un inhibidor de MDM2, un inhibidor de BCL2, un inhibidor de CHK1, un inhibidor de la vía de señalización del erizo activado, y un agente que degrada selectivamente el
15 receptor de estrógeno.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en Trabectedina, nab-paclitaxel, trebananib, pazopanib, cediranib, palbociclib,
20 everolimus, fluoropirimidina, IFL, regorafenib, reolisina, Alimta, Zykadia, Sutent, temsirolimus, axitinib, everolimus, sorafenib, Votrient, pazopanib, IMA-901, AGS-003, cabozantinib, vinflunina, un inhibidor de Hsp90, Ad-GM-CSF, temazolomida, IL-2, IFNa, vinblastina, talomid,
25 dacarbazina, ciclofosfamida, lenalidomida, azacitidina,

lenalidomida, bortezomid, amrubicina, carfilzomib, pralatrexato y enzastaurina.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede comprender uno o más agentes terapéuticos seleccionados del grupo que consiste en un adyuvante, un
5 agonista de TLR, factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) alfa, IL-1, HMGB1, un antagonista de IL-10, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-17, un antagonista de HVEM, un agonista
10 de ICOS, un tratamiento dirigido a CX3CL1, un tratamiento dirigido a CXCL9, un tratamiento dirigido a CXCL10, un tratamiento dirigido a CCL5, un agonista de LFA-1, un agonista de ICAM1 y un agonista de selectina.

En algunas modalidades, carboplatino, nab-
15 paclitaxel, paclitaxel, cisplatino, pemetrexed, gemcitabina, FOLFOX, o FOLFIRI se administran al sujeto.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-LAG-3,
20 un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-CD40, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-4-1BB, un anticuerpo anti-TIM3 o un anticuerpo anti-GITR.

25 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

También se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que contienen al menos uno (p. ej., uno, dos, tres o cuatro) de los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., biespecíficos) o fragmentos de unión al antígeno, o conjugados de anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno-anti-HER2/CLEC5A o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) descrito en la presente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera conocida en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas se formulan para ser compatibles con su vía de administración prevista (p. ej., intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea o intraperitoneal). Las composiciones pueden incluir un diluyente estéril (p. ej., agua estéril o solución salina), un aceite fijo, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos o antifúngicos, como alcohol bencílico o metilparabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares, antioxidantes, como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes, como ácido etilendiaminotetraacético, tampones, como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes isotónicos, como azúcares (p. ej., dextrosa), polialcoholes (p. ej., manitol o

sorbitol) o sales (p. ej., cloruro de sodio), o cualquier combinación de estos. Las suspensiones liposomales también pueden usarse como portadores farmacéuticamente aceptables (ver, p. ej., la Patente de los EE. UU. núm. 4.522.811).

- 5 Las preparaciones de las composiciones pueden formularse y encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples. Cuando se requiera (como en, por ejemplo, formulaciones inyectables), puede mantenerse una fluidez adecuada mediante, por ejemplo, el uso de un recubrimiento,
- 10 tal como lecitina, o un surfactante.

- Las composiciones que contienen uno o más de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, o conjugados de anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-
- 15 HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) descritos en la presente pueden formularse para administración parenteral (p. ej., intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, administración
- 20 cutánea o intraperitoneal) en forma de unidad de dosificación (es decir, unidades físicamente discretas que contienen una cantidad predeterminada de compuesto activo para facilitar administración y uniformidad de dosificación).

- 25 La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones pueden determinarse mediante procedimientos

farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales (p. ej., monos). Puede determinarse la LD50 (la dosis letal a 50 % de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población): el
5 índice terapéutico es la relación de LD50:ED50. Se prefieren los agentes que exhiben altos índices terapéuticos. Cuando un agente exhibe un efecto secundario indeseable, se debe tener cuidado de minimizar el daño potencial (es decir, reducir los efectos secundarios no
10 deseados). La toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse mediante otros procedimientos farmacéuticos estándar.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de
15 una dosificación apropiada de cualquier agente dado para usar en un sujeto (p. ej., un ser humano). Una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, o conjugados de anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos
20 anti-HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) será una cantidad que trate la enfermedad (p. ej., mata las células cancerosas) en un sujeto (p. ej., un sujeto humano identificado como que tiene cáncer), o un
25 sujeto identificado como en riesgo de desarrollar la enfermedad (p. ej., un sujeto que previamente ha

desarrollado cáncer pero que ahora se ha curado), disminuye la gravedad, frecuencia y/o duración de uno o más síntomas de una enfermedad en un sujeto (p. ej., un ser humano). La eficacia y dosificación de cualquiera de los anticuerpos o

5 fragmentos de unión al antígeno, o conjugados de anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A, o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) descritos en la

10 presente pueden determinarse por un profesional de la salud o un profesional veterinario usando métodos conocidos en la técnica, así como por la observación de uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto (p. ej., un ser humano). Ciertos factores pueden influir en la dosificación

15 y el tiempo requeridos para tratar efectivamente a un sujeto (p. ej., la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y la presencia de otras enfermedades).

Las dosis ilustrativas incluyen cantidades de

20 miligramos o microgramos de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, o conjugados de anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A o conjugados anticuerpo-

25 fármaco anti-HER2/CLEC5A) descritos en la presente por kilogramo de peso del sujeto (p. ej., aproximadamente 1

µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg; aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg; aproximadamente 100 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 5 mg/kg; aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg; o aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg). Aunque estas dosis cubren un amplio rango, un experto en la técnica entenderá que los agentes terapéuticos varían en su potencia, y las cantidades efectivas pueden determinarse mediante métodos conocidos en la técnica. Típicamente, al principio se administran dosis relativamente bajas, y el profesional de la salud tratante o profesional veterinario (en el caso de aplicación terapéutica) o un investigador (cuando aún trabaja en la etapa de desarrollo) puede subsecuente y gradualmente aumentar la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. Además, se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, género y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, y la vida media del agente terapéutico in vivo.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para la administración. La descripción también proporciona métodos para elaborar los anticuerpos

o fragmentos de unión al antígeno, o conjugados anticuerpo-fármaco (p. ej., anticuerpos anti-TAA/CLEC5A tales como anticuerpos anti-HER2/CLEC5A, fragmentos de unión al antígeno anti-HER2/CLEC5A, o conjugados anticuerpo-fármaco anti-HER2/CLEC5A) para diversos usos como se describe en la presente.

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Expresión de CLEC5A en subconjuntos de células inmunitarias en PBMC humanas

Se usó una estrategia de gating para evaluar subconjuntos de células inmunitarias en PBMC humanas (Figura 1A). Las PBMC congeladas de donantes sanos (Stanford Blood Center) se descongelaron, se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable (Zombie Aqua™, BioLegend) y después se etiquetaron con un panel de anticuerpos específicos para subconjuntos de células inmunitarias: CD45 (H130, BioLegend), CD3 (UCHT1, BioLegend), CD19 (HIB19, BioLegend), CD56 (5.1H11, BioLegend), CD14 (M5E2, BD Biosciences), CD16 (3G8, BioLegend), CD15 (HI98, BD Biosciences), and CLEC5A (283834, R&D Systems). Después de la tinción, las células

se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, se resuspendieron en regulador FACS (FBS inactivado por calor al 2 % (suero bovino fetal) en PBS (solución salina regulada con fosfato) con 0,05 % de BSA (albúmina sérica bovina)), y después se evaluaron mediante citometría de flujo (Attune™ CytPik™, Invitrogen). Como se muestra en la Figura 1B, se encontró que CLEC5A estaba altamente expresado en neutrófilos CD15+CD16+ y monocitos clásicos CD14+CD16-. Algunos CLEC5A también se expresaron en monocitos no clásicos CD14+CD16+ intermedios y CD14-CD16+.

Ejemplo 2: Expresión de CLEC5A en células mieloides asociadas a tumores en tumores sólidos humanos

Se evaluó la expresión de CLEC5A en células mieloides asociadas a tumores en tumores sólidos humanos. Se descongelaron células tumorales disociadas humanas congeladas (Discovery Life Sciences) de 6 indicaciones de tumores sólidos (cánceres de riñón, pulmón, ovario colorrectal, conducto biliar y páncreas), se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable (Zombie Aqua™, BioLegend) y después se etiquetaron con un panel de anticuerpos específicos para subconjuntos de células inmunitarias: CD45 (H130, BioLegend), CD3 (UCHT1, BioLegend), CD19 (HIB19, BioLegend), CD56 (5.1H11, BioLegend), CD14 (M5E2, BD Biosciences), CD16

(3G8, BioLegend), CD15 (HI98, BD Biosciences), CD11b (IRFCF44, Invitrogen), TREM2 (237920, R&D Systems), CD206 (15-2, BioLegend), y CLEC5A (283834, R&D Systems). Después de la tinción, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, se resuspendieron en regulador FACS (2 % de FBS inactivado por calor en PBS con 0,05 % de BSA), y después se evaluaron mediante citometría de flujo (Attune™ CytPik™, Invitrogen). Se utilizó una estrategia de limitación para evaluar subconjuntos de células inmunitarias en tumores sólidos humanos (Figura 2A). Como se muestra en las Figuras 2B-2C, la mayoría de los neutrófilos (80-98 %, denotados por viva/CD45+/CD19-/CD56-/CD15+/CD16+) y células mieloides no neutrófilos (> 43 %, denotadas por viva/CD45+/CD19-/CD3-/CD56-/CD15-) fueron positivas para CLEC5A en tumores humanos. La mayor expresión de CLEC5A se observó en células mieloides no neutrófilos. Se observó poca o ninguna expresión de la expresión de CLEC5A en células no inmunitarias (viva/CD45-) y se observó alguna expresión en un subconjunto de células (< 14 %) en una mezcla celular de las células B, T y NK (viva/CD45+/CD19+/CD3+/CD56+).

Ejemplo 3: Expresión de CLEC5A en macrófagos asociados a tumores (TAM, por sus siglas en inglés) en tumores sólidos humanos

Se evaluó la expresión de CLEC5A en macrófagos asociados a tumores (TAM) en tumores sólidos humanos. Específicamente, se descongelaron células tumorales disociadas humanas congeladas (Discovery Life Sciences) de 5 6 indicaciones de tumores sólidos (cánceres de riñón, pulmón, ovario colorrectal, conducto biliar y páncreas), se tiñeron con un colorante de viabilidad fijable (Zombie Aqua™, BioLegend) y después se etiquetaron con un panel de anticuerpos específicos para subconjuntos de células 10 inmunitarias: CD45 (H130, BioLegend), CD3 (UCHT1, BioLegend), CD19 (HIB19, BioLegend), CD56 (5.1H11, BioLegend), CD14 (M5E2, BD Biosciences), CD16 (3G8, BioLegend), CD15 (HI98, BD Biosciences), CD11b (IRFCF44, Invitrogen), TREM2 (237920, R&D Systems), CD206 15 (15-2, BioLegend), y CLEC5A (283834, R&D Systems). Después de la tinción, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron, se resuspendieron en regulador FACS (2 % de FBS inactivado por calor en PBS con 0,05 % de BSA), y después 20 se evaluaron mediante citometría de flujo (Attune™ CytPik™, Invitrogen). Se utilizó una estrategia de limitación para caracterizar células mieloides no neutrófilos (viva/CD45+/CD19-/CD3-/CD56-/CD15-) en células tumorales disociadas humanas (Figura 3A). Como se muestra en la Figura 3B, se 25 encontró que la mayoría (~ 30-60 %) de las células mieloides no neutrófilos eran TAM debido a su doble expresión de CD11b

y TREM2. Solo una porción de los TMA expresó CD206 (> 45 % de las células CD11b+). Como se muestra en las Figuras 3C-3D, CLEC5A se expresó altamente en la mayoría (> 70 %) de TAM TREM2+ y TAM CD206+.

5

Ejemplo 4. Generación de anticuerpos CLEC5A

Inmunización

Para generar anticuerpos monoclonales contra
10 CLEC5A, dos conejos blancos de Nueva Zelanda fueron
inmunizados con la proteína humana CLEC5A con etiqueta His
(Acro Biosystems, cat. núm.: CLA-H5243) siguiendo un
protocolo de inmunización en conejos de 63 días.
Específicamente, se inyectaron 400 µg de antígeno
15 emulsionado con CFA (adyuvante completo de Freun') el Día
1 por vía subcutánea durante la primera inyección, seguido
de 3 inyecciones subcutáneas adicionales (200 µg de
antígeno emulsionado con IFA (adyuvante incompleto de
Freun')) el Día 7, Día 21, Día 42, y un refuerzo intravenoso
20 final el Día 63.

Título del anticuerpo

Se recogieron 5 ml de suero de cada conejo el Día
28 y el Día 49 para la prueba de título. El título de
25 anticuerpos después de la inmunización se determinó
mediante la unión ELISA de sueros diluidos en serie a CLEC5A

humano. Brevemente, las placas de 96 pocillos se recubrieron con CLEC5A humano (1 µg/ml) durante la noche a 4 °C. Las placas fueron bloqueadas por PBS (pH 7,4, Fisher Scientific, cat. núm.: 21-040-CM) que contiene 1 % de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras (comenzando en 1:1000 de dilución de sueros y titulado 3 veces) se añadieron a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de lavados con PBS. Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo HRP Donkey (BioLegend, cat. núm.: A continuación se añadió 406401) a las placas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavados con PBS. Se añadió el sustrato a las placas y se incubó durante 5 minutos. La OD450 se midió usando un lector de placas (ClarioStar®).

15

Aislamiento de esplenocitos de conejo y clasificación de células B

Los bazo de conejo se cosecharon 5 días después de la última toma de refuerzo. Los esplenocitos se prepararon en un colador celular estéril colocado en el fondo de una placa de Petri estéril de 100 mm que contenía 20 ml RPMI + 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S). Usando fórceps estériles, los tejidos del bazo se transfirieron a un colador celular. En concreto, mientras se sujetaba un bazo con fórceps, el bazo se cortaba en pequeños trozos, los cuales después se prensaban a través de la malla del

colador celular. Los restos tisulares se lavaron con 10 ml de RPMI + 1 % P/S. Las células del bazo se transfirieron de la placa de Petri a un nuevo tubo cónico de 50 ml. Se añadió RPMI + 1 % P/S a un volumen final de 50 ml. Las

5 células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. Se añadió 13 ml de regulador ACK (Gibco Cat. núm.: A1049201) para resuspender las células. Las células suspendidas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se añadió RPMI + 1 % P/S para alcanzar

10 un volumen final de 50 ml. Las células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió en RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S. Las células se centrifugaron a $400 \times g$ durante 5 minutos y se aspiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 15 ml

15 RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S. Las células se pipetearon a través de un filtro celular de 100 μm en un tubo cónico de 50 ml para eliminar los grumos celulares. Después se sembraron esplenocitos a la densidad deseada (p. ej., 4×10^7 célula/ml) con un medio adecuado para la clasificación.

20 Los esplenocitos restantes se congelaron en 90 % de suero + 10 % DMSO a 6×10^7 células/vial ($\sim 1,8$ ml) a $-80^\circ C$ durante la noche. Las células congeladas se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

25 Para la clasificación de células B, se cultivaron esplenocitos recién aislados o descongelados ($\sim 2 \times 10^8$

esplenocitos) en medios de cultivo de células B (RPMI-1640, 15 % FBS, 1 × HEPES, 1 × 2-ME (2-mercaptoetanol), 1 % penicilina/estreptomicina) durante la noche antes de la clasificación. Se prepararon placas de alimentación de células B de 96 pocillos en consecuencia un día antes de la clasificación. El día de la clasificación, se recogieron esplenocitos suspendidos y sueltos adheridos pipeteando suavemente el medio contra la superficie de cultivo del matraz. A continuación, las células se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a 400 × g durante 3 minutos. El pellet celular se lavó dos veces con regulador de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) (1 × PBS + 0,5 % BSA). Se añadió un antígeno biotinilado a 5 µg/ml (concentración final). La mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 20 minutos. La mezcla de tinción se centrifugó entonces a 400 × g durante 3 minutos y las células se resuspendieron en regulador FACS. Las células se transfirieron a un tubo Eppendorf™ ámbar de 1,5 ml. A continuación, se añadieron a las células las mezclas de anticuerpos de tinción. La mezcla de tinción se incubó a 4 °C durante 15-30 minutos y luego se centrifugó a 400 × g durante 3 minutos. El pellet celular se lavó dos veces con regulador FACS. El pellet celular lavado se resuspendió a ~10⁷ células/ml en 1 × PBS + 1 % FBS. Usando FACS, las células B individuales específicas de antígenos se clasificaron en placas de 96 pocillos (20 placas para

cada conejo). Se cultivaron placas de cultivo de células B de 96 pocillos con células B clasificadas a 37 °C con 5 % CO₂ durante 12 días.

5 Cribado ELISA de cultivo de células B individuales,
sobrenadantes LEM y anticuerpo purificado

El día 8 posterior a la clasificación, se recogieron 15 µl de sobrenadante de cultivo de células B de cada pocillo para ELISA específico de antígenos.

- 10 Brevemente, los sobrenadantes de cultivo de células B se transfirieron a placas ELISA recubiertas con CLEC5A humanas (placas de 384 pocillos recubiertas con CLEC5A y bloqueadas con BSA). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron 3 veces con PBS más 0,05 %
- 15 Tween® 20. Los anticuerpos se detectaron usando sustrato IgG HRP + TMB anticonejo de cabra (VWR, cat. núm.: 5120-007). Después se seleccionaron sobrenadantes de células B que cumplieron con el corte OD₄₅₀ (>0,5 o 3 × más alto que el suero preinmune).

- 20 Se cribaron células B clasificadas mediante un cribado ELISA inicial de 1920 sobrenadantes de 40 placas (placas de 96 pocillos) para detectar anticuerpos específicos de CLEC5A humanos. Se identificaron aproximadamente más de 200 clones de células B de unión al
- 25 antígeno CLEC5A humanos (corte de ELISA OD = 0,9). El día 12 después de la clasificación, las placas de cultivo de

células B se centrifugaron a $400 \times g$ durante 3 minutos. Se recogieron sobrenadantes de clones positivos (con OD mayor que el corte seleccionado de 0,9 del ELISA específico para antígenos) y los gránulos celulares se conservaron en
5 100 μ l de escudo de ADN/ARN (Zymo, cat. núm.: R1100-250) en tubos de PCR de 250 μ l. Los sobrenadantes recolectados se sometieron a pruebas adicionales para confirmar los resultados de ELISA y la unión a la superficie celular.

Los genes de cadena pesada y ligera de los clones
10 positivos se clonaron en un módulo de expresión lineal (LEM). Después se transfectó el LEM en células de producción y los sobrenadantes de cultivo se ensayaron mediante ELISA como se describió anteriormente.

15 Cribado de anticuerpos específicos CLEC5A en la superficie celular

CLEC5A se expresa principalmente en células mieloides (monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas). Se aislaron monocitos periféricos de PBMC
20 purificadas con el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). El aislamiento de monocitos se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron aproximadamente 50.000 monocitos
25 sin dilución de sobrenadantes LEM de células B o anticuerpos purificados diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 %

BSA) durante 60 minutos en hielo, respectivamente. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con IgG anticonejo de burro marcado con FITC (BioLegend, cat. núm.: 406403) anticuerpo secundario. Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de FITC) de cada anticuerpo y se trazó con el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Se seleccionaron los 20 clones principales que mostraron unión a CLEC5A humano en la superficie celular y se clonaron en un LEM. Después de las pruebas, se seleccionaron 8 clones (6A5, 6G9, 14A2, 5C7, 7G10, 3A7, 13E6 y 9E11) que mostraron unión a CLEC5A humano en la superficie celular. Finalmente, se expresaron anticuerpos anti-CLEC5A recombinantes para ensayos funcionales adicionales.

Ejemplo 5. Anticuerpos quiméricos anti-CLEC5A y construcciones de moléculas

Para expresar anticuerpos quiméricos IgG1 de conejo/humanos, se sintetizaron regiones constantes de la cadena pesada (variante hIgG1-Hc-LALAPG) de IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera kappa humana (CL-kappa) y se clonaron en pcDNA3.4, respectivamente (mediante GeneScript). pcDNA3.4 que contiene hIgG1-Hc-LALAPG de IgG1 humana (pcDNA3.4-huIgG1-Hc-LALAPG) se digirió posteriormente con EcoRI/NheI para la clonación de

secuencias VH. Se utilizaron EcoRI/BSIWI para digerir las secuencias VL y el vector receptor – pcDNA3.4 que expresa CL-kappa humano (pcDNA3.4-huKappa-LC). Secuencias VH y VL de 8 anticuerpos anti-CLEC5A de conejo seleccionados, 6A5, 6G9, 14A2, 5C7, 7G10, 3A7, 13E6 y 9E11, y las del anticuerpo de referencia DX244 (VH: sec. con núm. de ident.: 93; VL: sec. con núm. de ident.: 94), se sintetizaron (por IDT) con secuencias diseñadas que se solapaban en ambos extremos 5' y 3', las cuales pueden recocer y ensamblar (ensamblaje de ADN NEB NEBuilder® HiFi) con los extremos correspondientes de vectores receptores. Las células competentes de E. coli (NEB® 5-alfa) se transformaron con el plásmido ensamblado que codifica el clon con las secuencias correctas, en base a los resultados de secuenciación (Elim Biopharm). Las células transformadas se cultivaron adicionalmente con LB que contenía carbenicilina (100 µg/ml) para la purificación del plásmido (Kits QIAGEN® Plasmid Plus). Los plásmidos se eluyeron en agua libre de nucleasas (Sigma) y se almacenaron a -80 °C.

20

Ejemplo 6. Transfección y purificación de anticuerpos quiméricos anti-CLEC5A

Todas las secuencias codificantes de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo se generaron por síntesis directa de ADN y se clonaron en un vector de expresión de mamífero. Se verificaron las secuencias

clonadas mediante secuenciación de Sanger. Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO) en el medio ChoGro™ (Mirus) suplementado con L-glutamina 4 mM y 0,33 % Poloxamer-188, que se diluyó a 4×10^6 células/ml con medio de cultivo celular fresco en el momento de la transfección. Las células se transfectaron por lipofección con 1 µg de ADN plásmido por 4×10^6 células. Las células transfectadas se mantuvieron en una incubadora con agitación a 125 rpm en ambiente de 5 % de CO₂ y 70 % de humedad a 32 °C.

Los niveles de expresión de proteínas se midieron cada 5 días. El sobrenadante celular se recogió por centrifugación después de 10-14 días después de la transfección y se filtró a través de un filtro de membrana PES (poliéter sulfona) de 0,22 µm. Los anticuerpos expresados se purificaron mediante cromatografía de Proteína A (resina TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650M, Tosoh) y los agregados se eliminaron mediante resinas de intercambio aniónico (TOYOPEARL NH2-750F, Tosoh).

Los anticuerpos purificados se analizaron por HPLC (Dionex Ultimate® 3000-RS UHPLC, ThermoFisher) controlados por el software Chromeleon®. Se usó una columna de exclusión por tamaño TSKgel UP-SW3000, 2 µm, 4,6 mm ID×15 cm (Tosoh) para resolver la pureza y agregación de anticuerpos. Todos los anticuerpos purificados tenían 97 % o mayor pureza de monómero, los cuales fueron esterilizados

a través de un filtro de membrana PES de 0,22 μm , y utilizados para ensayos de unión y funcionales.

Ejemplo 7. Unión de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos a macrófagos humanos

Se evaluaron las capacidades de unión de anticuerpos anti-CLEC5A (anticuerpos silenciados por FC) a macrófagos humanos. Monocitos CD14⁺ (purificados del donante de PBMC humano núm. 651 usando el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16, StemCell Technologies, cat. núm.: 19058) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días.

Se incubaron aproximadamente 50.000 macrófagos M0 con anticuerpos diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 % BSA) durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG PE humano (Jackson ImmunoResearch, cat. núm.: 109-116-170). Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de PE) de cada anticuerpo y se trazó con el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la Figura 4 y la tabla siguiente, los 8 anticuerpos anti-CLEC5A pueden unirse a células macrófagos M0 (CLEC5A⁺) con diversas afinidades.

Tabla 1. Anticuerpos anti-CLEC5A que se unen a macrófagos humanos

Ab anti-CLEC5A	EC50 de unión (nM)
6A5	9,80
6G9	6,84
14A2	3,99
5C7	3,93
7G10	2,06
3A7	0,96
13E6	2,57
9E11	1,59
DX244	2,80
Control negativo	-

5 Ejemplo 8. Liberación de TNF α de anticuerpos quiméricos anti-CLEC5A

Se evaluó la liberación de TNF α de anticuerpos anti-CLEC5A. Monocitos CD14⁺ (purificados del donante de PBMC humano núm. 651 usando el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16, StemCell Technologies, cat. núm.: 19058) se diferenciaron con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días seguido de polarizarlo a M1 con 50 ng/ml M-CSF y 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) durante 24 horas. Los anticuerpos anti-CLEC5A se diluyeron en serie y se recubrieron en una placa de 96 pocillos durante 24 horas a 4 °C. Después de la incubación, la placa se lavó con PBS. Se añadieron aproximadamente 100

mil macrófagos M1 a los pocillos recubiertos con anticuerpos anti-CLEC5A en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina). Después de 24 horas, se
5 recogieron los sobrenadantes y se midió TNF α usando un kit ELISA TNF α humano (R&D systems, cat. núm.: DY210-05) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis se determinaron los niveles de TNF α (en pg/ml) y se graficaron usando el software GraphPad Prism (Versión
10 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en **la Figura 5**, los 8 anticuerpos anti-CLEC5A mostraron un nivel moderado de liberación de TNF α , que fue menor que el del punto de referencia DX244, lo que sugiere que los anticuerpos anti-CLEC5A pueden tener un perfil seguro.

15

Ejemplo 9. Unión de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos a CLEC5A de ratón y humano

La unión ELISA se usó para evaluar si los anticuerpos CLEC5A FC-silenciado pueden reaccionar de forma
20 cruzada con la proteína CLEC5A recombinante de ratón. Placas Corning de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Cat. núm.: 3361) se recubrieron con 1 μ g/ml de CLEC5A de ratón (R&D Systems, cat. núm.: 8438-CL-050) durante 48 horas a 4 °C. Se aspiró el antígeno proteico, y los pocillos
25 se lavaron 3 veces con 400 μ l de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Los

anticuerpos CLEC5A silenciados FC se prepararon como anticuerpo primario a 5 µg/ml y se diluyeron en serie 3 veces a través de 11 puntos (concentraciones diluidas) con regulador reactivo (PBS + 0,05 % BSA). Se añadieron 100 µl

5 de anticuerpo primario a los pocillos apropiados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo primario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. El anticuerpo secundario

10 BioLegend de burro anti-HRP humano (Cat. núm.: 410902) se diluyó 1:10.000 en regulador reactivo (PBS + 0,5 % BSA), y se añadieron 100 µl por pocillo, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo secundario, y los pocillos se lavaron 3 veces

15 con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se añadió 100 µl de Termo Turbo TMB de 1 etapa (Cat. núm.: 34022) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió 100 µl de solución de parada de Ácido

20 Sulfúrico Fisher 1N (Cat. núm.: SA212-2) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm. Para el análisis, se trazó OD450 de cada anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en **la Figura 6** y la tabla siguiente,

25 los anticuerpos anti-CLEC5A 6A5, 14A2 y 5C7 exhibieron reactividades cruzadas con CLEC5A de ratón.

Tabla 2. Anticuerpos anti-CLEC5A que se unen al CLEC5A de ratón

Ab anti-CLEC5A	EC50 de unión (nM)
6A5	0,1205
14A2	0,1844
5C7	0,1936
DX244	51,18
Control negativo	-

5 Para la unión de BLI (Interferometría Bio-Capa), se capturaron 10 µg/ml de anticuerpos anti-CLEC5A en una sonda Fc de IgG antihumana (Gator Bio, cat. núm.: 160024), seguido de la medición de asociación y disociación con CLEC5A humano recombinante, etiqueta His (ACROBiosystems, cat. núm.: NC1-H52H4) a una concentración única de 11 nM en PBS + 0,05 % Tween® 20. La KD absoluta se determinó aplicando un modelo de unión 1:1. Los resultados de los ensayos de unión de BLI se muestran en las **Figuras 7A-7B**. Los resultados indican que los anticuerpos anti-CLEC5A 3A7 y 5C7 pueden unirse a CLEC5A humano con altas afinidades.

10

15

Ejemplo 10. Humanización de anticuerpos anti-CLEC5A quiméricos y unión a ELISA

Cuatro clones de anticuerpos monoclonales CLEC5A antihumanos de conejo, 3A7, 5C7, 6A5, 7G10 y 13E6 se humanizaron injertando las CDR de los anticuerpos principales en marcos de línea germinal humana

20

seleccionados más cercanos a los marcos de conejo identificados por IgBLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) y/o IMGT/DomainGapAlign (www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi). IGHV de línea germinal humana, 5 IGHJ, IGKV, IGHJ e IGKJ se seleccionaron con base en la similitud de secuencia dentro de ambos marcos y CDR. Ciertos residuos del marco de la línea germinal humana se volvieron a mutar a los correspondientes residuos de conejo para mantener la estructura del bucle canónico y la interfaz 10 cadena ligera/cadena pesada (Padlan E.A., Mol. Immunol., 1994, 31:169; Foote J. y Winter G., JMB, 1992, 224:487). Por humanización, se generaron anticuerpos humanizados h3A7, h5C7, h6A5, h7G10 y h13E6.

La unión ELISA se realizó para evaluar si los 15 anticuerpos anti-CLEC5A humanizados pueden unirse a la proteína CLEC5A humana recombinante en comparación con los clones parentales quiméricos correspondientes. Placas Corning de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Cat. núm.: 3361) se recubrieron con 1 µg/ml de CLEC5A humano 20 (AcrobioSystems, cat. núm.: CLA-H5243) durante 48 horas a 4 °C. Se aspiró el antígeno proteico, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se prepararon anticuerpos anti-CLEC5A como anticuerpo primario 25 a 5 µg/ml y se diluyeron en serie 3 veces hasta 11 puntos (concentraciones diluidas) con regulador reactivo (PBS +

0,05 % BSA). Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario a los pocillos apropiados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo primario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. El anticuerpo secundario BioLegend de burro anti-HRP humano (Cat. núm.: 410902) se diluyó 1:10.000 en regulador reactivo (PBS + 0,5 % BSA), se añadieron 100 µL por pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo secundario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µL de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. 100 µL de Thermo Turbo TMB de 1 paso (Cat. núm.: 34022) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. 100 µl de ácido Sulfúrico Fisher 1N (Cat. núm.: Se añadió solución de parada SA212-2) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm. Para el análisis, se trazó la OD450 de cada anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en **las Figuras 8A-8E** y la tabla siguiente, todos los formatos humanizados de anticuerpos anti-CLEC5A mostraron afinidades similares a la proteína CLEC5A humana en comparación con los clones parentales quiméricos correspondientes, lo que sugiere que la humanización fue exitosa para los clones anteriores.

Tabla 3. Anticuerpos anti-CLEC5A humanizados que se
enlazan a CLEC5A humano mediante ELISA

Clon de anticuerpo	EC50 quimérica (nM)	EC50 humanizada (nM)
3A7	0,71	0,47
5C7	0,90	0,44
6A5	0,31	0,33
7G10	0,16	0,22
13E6	0,61	0,12

5 Ejemplo 11. Construcciones de moléculas de anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A

Se generaron seis formatos diferentes de anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A como se muestra en las **Figuras 9A-9F**. Las células competentes de E. coli (NEB® 5-
10 alfa) se transformaron con el plásmido ensamblado que codifica el clon con las secuencias correctas, basado en los resultados de secuenciación (Elim Biopharm). Las células transformadas se cultivaron adicionalmente con LB que contenía carbenicilina (100 µg/ml) para la purificación
15 del plásmido (QIAGEN® Plasmid Plus Kits). Los plásmidos se eluyeron en agua libre de nucleasas (Sigma) y se almacenaron a -80 °C.

Los anticuerpos se expresaron con células CHO (ExpiCHO™ Expression System, Gibco) por transfección tanto
20 de pcDNA3.4-huIgG1-Hc and pcDNA3.4-huKappa-Lc que contienen secuencias de VH y VL emparejadas. Las células ExpiCHO™ se cultivaron con el medio de expresión ExpiCHO™ y se

mantuvieron entre $0,3$ a $6 \times 10^6/\text{ml}$ de acuerdo con la recomendación del fabricante a 37°C , 125 rpm , 5% de CO_2 y 80% de humedad. En un matraz desbocado de 125 ml , se prepararon 25 ml de células ExpiCHO™ frescas ($6 \times 10^6/\text{ml}$ y

5 viabilidad $> 95\%$) a partir de cultivo de 1 día de duración sembrado a $3 \times 10^6/\text{ml}$. Se mezcló bien 1 ml de medio libre de suero (OptiPRO™ SFM, Gibco) que contenía tanto pcDNA3.4-huIgG1-Hc y pcDNA3.4-huKappa-Lc ($12\text{ }\mu\text{g}$ de cada plásmido) mediante pipeteo con 1 ml OptiPRO™ SFM que contenía $80\text{ }\mu\text{l}$

10 de reactivo de transfección (Reactivo ExpiFectamine™ CHO, Gibco). La mezcla de transfección se añadió entonces a 25 ml de células ExpiCHO™ y se cultivó a 37°C . Al día siguiente, el cultivo de transfección se transfirió a una incubadora de 32°C después de añadir $150\text{ }\mu\text{l}$ ExpiFectamine™

15 Fortalecedor CHO, 6 ml alimentación ExpiCHO™ y $1\times$ penicilina/estreptomicina (Gibco). Se monitoreó la densidad celular y viabilidad del cultivo de transfección y se determinó el título de anticuerpos IgG1 en el medio usando tecnología BLI con biosensor de Proteína A (Gator Bio).

20 Después de aproximadamente 5 días, se recogió el medio de cultivo que contenía anticuerpos IgG1 secretados (por centrifugación a $2000 \times g$, 10 minutos), se filtró (Filtro Desechable Estéril Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™) y se purificó adicionalmente usando resina de Proteína A

25 (TOYOPEARL AF-rProtein A Hc-650F) columna de flujo por gravedad empaquetada (Bio-Rad). Los anticuerpos IgG1 se

eluyeron con 3,5 ml de glicina-HCl (100 mM, pH 2,7), se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 8,5), se dializaron con casetes de diálisis Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer™ G2 (20K MWCO) en regulador PBS 1× (pH 7,2) y se almacenaron a 4 °C. Se determinó la concentración del anticuerpo IgG1 purificado con un espectrofotómetro UV-Vis de Microvolumen NanoDrop™ One/OneC (Thermo Scientific™) y se comprobó la calidad del anticuerpo IgG1 mediante gel SDS-PAGE en condiciones tanto desnaturalizantes como no desnaturalizantes.

Ejemplo 12. Transfección y purificación de anticuerpos bienespecíficos TAA/CLEC5A

Todas las secuencias codificantes de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpos se generaron por síntesis directa del ADN y se clonaron en vectores de expresión de mamíferos. Se verificaron las secuencias clonadas mediante secuenciación de Sanger.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) se cultivaron en medio CHOgro™ (Mirus) suplementado con L-glutamina 4 mM y 0,33 % Poloxamer-188, que se diluyó a 4×10^6 células/ml con medios de cultivo celular frescos en el momento de la transfección. Las células se transfectaron por lipofección con 1 µg de ADN plásmido por 4×10^6 células. Las células transfectadas se mantuvieron en una

incubadora con agitación a 125 rpm en 5 % de CO₂ y 70 % de humedad ambiental a 32 °C.

Los niveles de expresión de proteínas se midieron cada 5 días. El sobrenadante celular se recogió por centrifugación después de 10-14 días después de la transfección y se filtró a través de un filtro de membrana PES de 0,22 µm. Los anticuerpos expresados se purificaron mediante cromatografía de Proteína A (resina TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650M, Tosoh) y los agregados se eliminaron mediante resinas de intercambio aniónico (TOYOPEARL NH2-750F, Tosoh).

Los anticuerpos purificados se analizaron por HPLC (Dionex Ultimate® 3000-RS UHPLC, Thermo Fisher) controlados por el software Chromeleon®. Se usó una columna de exclusión por tamaño TSKgel UP-SW3000, 2 µm, 4,6 mm ID×15 cm (Tosoh) para resolver la pureza y agregación de anticuerpos.

Todos los anticuerpos purificados tenían 97 % o mayor pureza de monómero, los cuales fueron esterilizados a través de un filtro de membrana PES de 0,22 µm, y usados para ensayos de unión y funcionales.

Ejemplo 13. Unión del anticuerpo biespecífico HER2/CLEC5A a macrófagos humanos

Se evaluaron las capacidades de unión de anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A a macrófagos humanos.

Monocitos CD14⁺ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 441 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a

5 macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Se incubaron aproximadamente 50.000 macrófagos M0 con anticuerpos diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 % BSA) durante 30 minutos en

10 hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG PE humano (Jackson ImmunoResearch, cat. núm.: 109-116-170). Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de PE) de cada anticuerpo y se trazó con

15 el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.).

Como se muestra en la **Figura 10** y la tabla siguiente, tanto el formato 2+2 A como el formato 1+1 A de anticuerpos HER2/CLEC5A unidos a células macrófagos M0

20 (CLEC5A⁺) con afinidades diferentes. No obstante, las afinidades de unión de los anticuerpos HER2/CLEC5A de formato 2+2 fueron menores en comparación con los anticuerpos de formato 1+1. Se usaron secuencias de los anticuerpos quiméricos conejo-humano 3A7 y 5C7.

25 Tabla 4. Unión de anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A a macrófagos humanos

Anticuerpo	EC50 (nM)
HER2/3A7 (2+2 A) Fc-silenciado	1,183
HER2/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado	3,115
HER2/3A7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,6112
HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado	1,494
Control negativo	N/D

Ejemplo 14. Unión de anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A a macrófagos humanos

5 Se evaluaron capacidades de unión de diferentes anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A a macrófagos humanos. Monocitos CD14⁺ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 900 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, 10 cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Se incubaron aproximadamente 50.000 macrófagos M0 con anticuerpos diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 % 15 BSA) durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG PE humano (Jackson ImmunoResearch, cat. núm.: 109-116-170). Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de 20 PE) de cada anticuerpo y se trazó con el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en las **Figuras 11-12** y la tabla siguiente,

diferentes anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A pueden unirse a células macrófagos M0 (CLEC5A+).

Tabla 5. Anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A que se unen a macrófagos humanos

5

Anticuerpo	EC50 (nM)
HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	10,76
EGFR1/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	18,98
EGFR2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	19,49
EpCAM/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	7,35
5C7 Fc-silenciado	0,49
Control negativo	N/D

Ejemplo 15. Unión de anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A a CLEC5A humano

La unión ELISA se realizó para evaluar las

10 afinidades de diferentes anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A para la proteína CLEC5A humana recombinante. Placas Corning de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Cat. núm.: 3361) se recubrieron con 1 µg/ml de CLEC5A humano (AcrobioSystems, cat. núm.: CLA-H5243) durante 48

15 horas a 4 °C. Se aspiró el antígeno proteico, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se prepararon anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A como el anticuerpo primario a 5 µg/ml y se diluyeron en serie 3

20 veces a través de 11 puntos (concentraciones diluidas) con regulador reactivo (PBS + 0,05 % BSA). Se añadieron 100 µl

de anticuerpo primario a los pocillos apropiados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo primario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. El anticuerpo secundario BioLegend de burro anti-HRP humano (Cat. núm.: 410902) se diluyó 1:10.000 en regulador reactivo (PBS + 0,5 % BSA), y se añadieron 100 µl por pocillo, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo secundario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se añadió 100 µl de Termo Turbo TMB de 1 etapa (Cat. núm.: 34022) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió 100 µl de solución de parada de Ácido Sulfúrico Fisher 1N (Cat. núm.: SA212-2) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm. Para el análisis, se trazó OD450 de cada anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la **Figura 13** y la tabla siguiente, todos los anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A tuvieron afinidades similares para CLEC5A humano.

Tabla 6. Anticuerpos biespecíficos TAA/CLEC5A que se unen al CLEC5A humano

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)
------------	--------------

HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,089
EGFR1/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,072
EGFR2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,081
EpCAM/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,064
5C7 Fc-silenciado	0,158
Control negativo	N/D

Ejemplo 16. Unión de anticuerpos biespecíficos

HER2/CLEC5A a HER2 humano

La unión ELISA se realizó para determinar la

5 afinidad de anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A para la proteína HER2 humana recombinante. Placas Corning de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Cat. núm.: 3361) se recubrieron con 1 µg/ml de HER2 humano (AcrobioSystems, cat. núm.: HE2-H52R8) durante 48 horas a 4°C. Se aspiró el

10 antígeno proteico, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. El anticuerpo HER2/CLEC5A (2+2 A) Fc-optimizado se preparó como anticuerpo primario a 5 µg/ml y se diluyó en serie 3 veces hasta 11 puntos

15 (concentraciones diluidas) con regulador reactivo (PBS + 0,05 % BSA). Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario a los pocillos apropiados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo primario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de

20 lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. El anticuerpo secundario BioLegend de burro anti-HRP humano (Cat. núm.: 410902) se diluyó 1:10.000 en

regulador reactivo (PBS + 0,5 % BSA), y se añadieron 100 µl por pocillo, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo secundario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se añadió 100 µl de Thermo Turbo TMB de 1 etapa (Cat. núm.: 34022) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió 100 µl de solución de parada de Ácido Sulfúrico Fisher 1N (Cat. núm.: SA212-2) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm. Para el análisis, se trazó OD450 de cada anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la **Figura 14** y la tabla siguiente, el anticuerpo biespecífico HER2/CLEC5A se une a HER2 humano con una alta afinidad.

Tabla 7: Anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A que se unen al HER2 humano

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)
HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,068
Control negativo	N/D

Ejemplo 17. Unión de anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A a EGFR humano

La unión a ELISA se realizó para determinar las afinidades de diferentes anticuerpos anti-EGFR hIgG1

(Cetuximab, Panitumumab, Necitumumab, Eg-B4-VHH) and EGFR/CLEC5A (2+2 A) Fc-optimizado con porción EGFR de Amivantamab (EGFR1) y Nimotuzumab (EGFR2) para proteína EGFR humana recombinante. Específicamente, las placas

5 Corning de 96 pocillos de fondo plano de alta unión (Cat. núm.: 3361) se recubrieron con 1 µg/ml de EGFR humano (ACROBiosystems, cat. núm.: EGR-H5222) durante 48 horas a 4 °C. Se aspiró el antígeno proteico, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 %

10 Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de placas. Se prepararon anticuerpos EGFR hIgG1 y EGFR/CLEC5A (2+2A) Fc-optimizados como el anticuerpo primario a 5 µg/ml y se diluyeron en serie 3 veces a través de 11 puntos (concentraciones diluidas) con regulador reactivo (PBS +

15 0,05 % BSA). Se añadieron 100 µl de anticuerpo primario a los pocillos apropiados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo primario, y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de

20 placas. El anticuerpo secundario BioLegend de burro anti-HRP humano (Cat. núm.: 410902) se diluyó 1:10.000 en regulador reactivo (PBS + 0,5 % BSA), y se añadieron 100 µl por pocillo, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró el anticuerpo secundario,

25 y los pocillos se lavaron 3 veces con 400 µl de regulador de lavado (0,05 % Tween® 20 en PBS) usando una lavadora de

placas. Se añadió 100 µl de Thermo Turbo TMB de 1 etapa (Cat. núm.: 34022) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadió 100 µl de solución de parada de Ácido Sulfúrico Fisher 1N (Cat. 5 núm.: SA212-2) a cada pocillo y se leyó la placa en un lector de placas a 450 nm. Para el análisis, se trazó OD450 de cada anticuerpo usando el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la **Figura 15** y en la tabla siguiente, los anticuerpos 10 biespecíficos EGFR/CLEC5A (2+2A) mostraron afinidades de unión menores al EGFR humano en comparación con Cetuximab y Necitumumab.

Tabla 8: Anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A que se unen al EGFR humano

15

Anticuerpo	EC50 (µg/ml)
EGFR1/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,031
EGFR2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,120
Cetuximab	0,025
Necitumumab	0,022
Panitumumab	6,64
Eg-B4-VHH	0,03
Control negativo	N/D

Ejemplo 18. Unión de anticuerpos biespecíficos

EpCAM/CLEC5A a DLD-1

Se evaluaron las capacidades de unión de un 20 anticuerpo anti-EpCAM (forma IgG de la parte de unión de EpCAM Solitomab) y anticuerpos EpCAM/CLEC5A (2+2 A) Fc-

optimizado a células DLD-1 (EpCAM+). Se incubaron aproximadamente 50.000 células DLD-1 (ATCC, CCL-221) con anticuerpos diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 % BSA) durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG PE humano (Jackson ImmunoResearch, cat. núm.: 109-116-170). Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de PE) de cada anticuerpo y se trazó con el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la **Figura 16** y la tabla siguiente, el anticuerpo anti-EpCAM mostró una mayor afinidad de unión en comparación con el anticuerpo biespecífico EpCAM/CLEC5A a las células DLD-1.

Tabla 9: Anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A que se unen a DLD-1

Anticuerpo	EC50 (nM)
EpCAM/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	1,1
Anticuerpo anti-EpCAM	0,67
Control negativo	N/D

Ejemplo 19. Unión de anticuerpos biespecíficos

CD79b/CLEC5A a células Ramos

Se evaluaron las capacidades de unión de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A a células Ramos (CD79b+). Se incubaron aproximadamente 50.000 células Ramos

(ATCC, CRL-1596) con anticuerpos diluidos en serie en regulador FACS (PBS + 0,5 % BSA) durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces y se detectaron con anticuerpo secundario anti-IgG PE humano (Jackson ImmunoResearch, cat. núm.: 109-116-170). Para el análisis, se determinó la intensidad media de fluorescencia (MFI de PE) de cada anticuerpo y se trazó con el software GraphPad Prism (Versión 9.4.1; GraphPad Software Inc.). Como se muestra en la **Figura 17**, los resultados sugieren que tanto los formatos 2+2 A como 2+2 B de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A tenían afinidad similar por las células Ramos.

Ejemplo 20. Los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A mediaron la destrucción de células SK-BR-3 por macrófagos M0

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A para matar las células SK-BR-3 cancerosas diana (HER2+) por macrófagos efectores (CLEC5A+) células M0 tanto a través del mecanismo de fagocitosis como de trogocitosis. Específicamente, los monocitos CD14+ (purificados del donante núm. 031 de PBMC humanas con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF,

StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células SK-BR-3 se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ SK-BR-3 (relación de E:T de

5 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas

10 SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células SK-BR-3 fueron compuestas como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recogiendo un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de

15 destrucción de células diana se calculó como: (Número absoluto de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin tratamiento - Número absoluto de células CFSE+ SYTOX- SK-BR-3 en el grupo de tratamiento)/Número absoluto de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin tratamiento × 100.

20 Como se muestra en las **Figuras 18A-18C** y la tabla siguiente, los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A mataron eficientemente a la célula cancerosa HER2+ SK-BR-3, lo que indica que las células tumorales que expresan el antígeno diana HER2 pueden ser eliminadas con anticuerpos

25 biespecíficos HER2/CLEC5A reclutando macrófagos.

Tabla 10. Los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A
mediaron la destrucción de células SK-BR-3 por macrófagos
M0

Anticuerpo	IC50 (nM)
HER2/3A7 (2+2 A) Fc-silenciado	0,0408
HER2/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado	0,0614
HER2/3A7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,114
HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,148
HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,006

5

Ejemplo 21. Los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A
mediaron la destrucción de células SK-BR-3 por macrófagos
M1 y M2

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos

10 biespecíficos HER2/CLEC5A para matar células SK-BR-3 cancerosas diana (HER2+) por macrófagos efectoras (CLEC5A+) células polarizadas a estados M1 o M2 a través del mecanismo de fagocitosis como de trogocitosis. Monocitos CD14+ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 900 con Kit

15 de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días.

20 El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) a M1 o 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.:

78024), a M2 por otras 24 horas (Día 7). Las células SK-BR-3 se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ SK-BR-3 (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células SK-BR-3 fueron compuestas como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recogiendo un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (Número absoluto de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin tratamiento - Número absoluto de células CFSE+ SYTOX- SK-BR-3 en el grupo de tratamiento)/Número absoluto de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en la **Figura 19** y la tabla siguiente, sorprendentemente, los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A pueden matar de manera eficiente las células cancerosas HER2+ SK-BR-3 reclutando macrófagos M1 y M2.

Tabla 11: Los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A mediaron la destrucción de células SK-BR-3 por macrófagos M1 y M2

Célula efectora	Anticuerpo	IC50 (nM)
M1	HER2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,03226
	Control negativo de M1	1,474
M2	HER2/5C7 (2+2 A) Fc- optimizado	0,006553
	Control negativo de M2	0,1491

Ejemplo 22. Producción de citocina por anticuerpos

biespecíficos HER2/CLEC5A

5 Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A para activar macrófagos polarizados M1 y M2 en presencia o ausencia de células SK-BR-3 diana (HER2+). Monocitos CD14+ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 900 con Kit de Enriquecimiento

10 de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0

15 se polarizaron con 50 ng/ml de IFN-γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) a M1 o 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024), a M2 por otras 24 horas (Día 7). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 SK-BR-3 (relación de E:T de 5:1) en

20 presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para

el análisis de citocina. La citocina IFN- γ se midió con el kit humano V-PLEX Plus Proinflamatorio Panel 1 (Meso Scale Discovery, cat. núm.: K15049G-1). Como se muestra en la **Figura 20**, el anticuerpo biespecífico HER2/CLEC5A activó tanto los macrófagos M1 como M2 solo en presencia de SK-BR-3, con bajo nivel de liberación de citocinas.

Ejemplo 23. Efectos del plasma y la hIgG1 sobre la destrucción de células diana mediada por anticuerpos

biespecíficos HER2/CLEC5A

Se evaluaron los efectos del plasma humano y del anticuerpo hIgG1 purificado sobre la destrucción mediada por el anticuerpo HER2/CLEC5A de células SK-BR-3 cancerosas diana (HER2+) por macrófagos efectores (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 308 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células SK-BR-3 se etiquetaron con CFSE (Thermofisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ SK-BR-3 (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C en

presencia de medio (control), 50 % de plasma (heparina), o hIgG1 (BioLegend, cat. núm.: 403502). Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™

5 (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytek®. Las células SK-BR-3 fueron compuestas como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recogiendo un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de

10 destrucción de células diana se calculó como: (Número absoluto de número de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin tratamiento - Número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- SK-BR-3 en el grupo de tratamiento)/Número absoluto de número de células CFSE+ SK-BR-3 en el grupo sin

15 tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 21A-21C** y la tabla siguiente, no hubo una reducción significativa en la actividad de diferentes anticuerpos biespecíficos HER2/CLEC5A incluso en presencia de plasma o hIgG1.

Tabla 12. Muerte de células diana mediada por anticuerpos

20 biespecíficos HER2/CLEC5A en presencia de medio, plasma o hIgG1

Presencia	Anticuerpo	IC50 (nM)
medio	HER2/5C7 (2+2A) Fc-optimizado	0,006835
	HER2/5C7 (2+2A) Fc-silenciado	0,01416
	HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,04809
	4D5 Fc-silenciado	N/D
plasma	HER2/5C7 (2+2A) Fc-optimizado	0,02378

	HER2/5C7 (2+2A) Fc-silenciado	0,06766
	HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,4332
	4D5 Fc-silenciado	N/D
hIgG1	HER2/5C7 (2+2A) Fc-optimizado	0,004859
	HER2/5C7 (2+2A) Fc-silenciado	0,00761
	HER2/5C7 (1+1 A) Fc-silenciado	0,00632
	4D5 Fc-silenciado	N/D

Ejemplo 24. Los anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A
mediaron la destrucción de células DLD-1 por macrófagos

Se evaluó la capacidad de diferentes anticuerpos

5 EGFR hIgG1 (Cetuximab, Panitumumab, Necitumumab, Eg-B4-VHH) y EGFR/CLEC5A (2+2 A) Fc-optimizado con la porción de EGFR de los anticuerpos Amivantamab (EGFR1) y Nimotuzumab (EGFR2) para matar células DLD-1 cancerosas diana (EGFR+) por macrófagos efectores (CLEC5A+) a través de mecanismos

10 de fagocitosis y trogocitosis. Específicamente, los monocitos CD14+ (purificados del donante núm. 900 de PBMC humanas con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con

15 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células DLD-1 se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ DLD-1

20 (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS

inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. 5 núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células DLD-1 se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recogiendo un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó 10 como: (Número absoluto de número de células CFSE+ DLD-1 en el grupo sin tratamiento - Número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- DLD-1 en el grupo de tratamiento)/Número absoluto de número de células CFSE+ DLD-1 en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra 15 en la **Figura 22** y la tabla siguiente, los anticuerpos biespecíficos EGFR/CLEC5A tenían una alta potencia para matar células diana EGFR+.

Tabla 13: Los BsAb EGFR/CLEC5A mediaron la destrucción de células DLD-1 por macrófagos

20

Anticuerpo	IC50 (nM)
EGFR1/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,001483
EGFR2/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,004711
Panitumumab	0,6415
Cetuximab	0,7918
Necitumumab	0,05742
Eg-B4-VHH	3,861
Control negativo	N/D

Ejemplo 25. Los anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A
mediaron la destrucción de células DLD-1 por macrófagos

Se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-EpCAM (parte de unión de Solitomab EpCAM en forma de IgG) y anticuerpos EpCAM/CLEC5A (2+2 A) Fc-optimizado para matar células DLD-1 cancerosas diana (EpCAM+) por macrófagos efectores (CLEC5A+) a través de mecanismos de fagocitosis y trogocitosis. Monocitos CD14+ (purificados del donante de PBMC humanas núm. 900 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células DLD-1 se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ DLD-1 (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células DLD-1 se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recogiendo un volumen fijo para todas las

condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (Número absoluto de número de células CFSE+ DLD-1 en el grupo sin tratamiento - Número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- DLD-1 en el grupo de tratamiento)/Número absoluto de número de células CFSE+ DLD-1 en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en la **Figura 23** y la tabla siguiente, el anticuerpo biespecífico EpCAM/CLEC5A tenía una alta potencia de matar células diana de EpCAM+.

10 Tabla 14: Los BsAb EpCAM/CLEC5A mediaron la destrucción de células DLD-1 por macrófagos

Anticuerpo	IC50 (nM)
EpCAM/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,003504
Anticuerpo anti-EpCAM	0,0812
Control negativo	0,101

15 Ejemplo 26. Los anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A mediaron la destrucción de varias células cancerosas por macrófagos

Se evaluó el nivel de expresión de hEpCAM en diversas líneas de células cancerosas. Se utilizaron diversas líneas celulares cancerosas A549, DLD-1, MCF-7, SKPR3, SKOV3 y T47D. Se tiñeron 50.000 células cancerosas con 0,5 nM anticuerpo anti-EpCAM-AF488 (dilución 1:200, BioLegend, cat. núm.: 302208) durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron con PBS dos veces, y después

se tiñeron con DAPI (dilución 1:5000 a partir de 1 mg/ml, Invitrogen, cat. núm.: D1306) durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de probarse mediante citometría de flujo (Cytek®, Northen Lights™). Los datos en crudo fueron analizados por FlowJo™ Portal 10 y se graficaron usando GraphPad Prism 10. Como se muestra en la Figura 24, estas líneas celulares mostraron una densidad de EpCAM distinta. Se evaluaron los efectos de los anticuerpos biespecíficos EpCAM/CLEC5A para matar líneas celulares diana de densidad distinta de EpCAM mediante macrófagos efectores M0. Se utilizaron diversas líneas celulares cancerosas A549, DLD-1, MCF-7, SKPR3, SKOV3 y T47D. Monocitos CD14+ (purificados de PBMC humanas con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células cancerosas se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ células cancerosas (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en

100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células cancerosas se limitaron como como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular

5 absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células CFSE+ cancerosas en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+

10 SYTOX- cancerosas en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ cancerosas en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 25A-25F**, el anticuerpo biespecífico EpCAM/CLEC5A tenía una alta potencia para matar células diana con distinta densidad de

15 EpCAM.

Ejemplo 27. Diferentes acopladores de células mieloides mediaron la destrucción celular del cáncer de mieloma múltiple por las PBMC

20 Se evaluó la eficacia de destrucción de células cancerosas de mieloma múltiple (NCI-H929) en PBMC humanas sanas por acopladores de células mieloides. Específicamente, los acopladores de células mieloides (p. ej., GPRC5D/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado, BCMA/5C7 (2+2 A) Fc-

25 optimizado, CD38/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado) se diluyeron en serie. Las células NCI-H929 (como células diana) se

tiñeron primero con CFSE, después se mezclaron con PBMC humanas sanas (E:T= 10:1) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos, que se incubó adicionalmente con anticuerpos biespecíficos diluidos en serie, (dilución 1 a 3 de 100 nM) durante 48 horas. Después de la incubación, la placa se hizo girar hacia abajo y las células se tiñeron con colorante de tinción vivo/muerto. Las células teñidas se procesaron después usando una citometría de flujo CytoFLEX LX. El porcentaje de destrucción celular se calculó como:

(número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento - número de células tumorales vivas en el grupo de tratamiento) / número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento × 100.

Los resultados se muestran en la **Figura 26**. El porcentaje máximo de destrucción fue aproximadamente 99 % para los anticuerpos biespecíficos BCMA/5C7 (2+2 A) Fc optimizado y CD38/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado) en la destrucción de NCI-H929; y el porcentaje máximo de destrucción fue aproximadamente 92 % para el anticuerpo biespecífico GPRC5D/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado. Los resultados indican que los acopladores mieloides pueden matar eficientemente múltiples células cancerosas mieloides con dianas distintas.

Ejemplo 28. Nivel de expresión de CD79b en líneas
celulares de linfoma maligno y células B en donantes
sanos de PBMC

Se evaluó el nivel de expresión de hCD79b en
5 líneas celulares de linfoma maligno y células B en donantes
de PBMC sanos. Las líneas de células de linfoma maligno
(Ramos y Daudi) se obtuvieron de ATCC y las PBMC congeladas
se obtuvieron de donantes sanos (Stanford Blood Center).
Se tiñeron 50.000 células Ramos o Daudi y 20.0000 PBMC con
10 0,5 nM anticuerpo anti-CD79b-AF488 y anticuerpo anti-CD19-
PE (dilución 1:200, BioLegend, cat. núm.: 302208) durante
30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron con PBS dos
veces, y después se tiñeron con DAPI (dilución 1:5000 a
partir de 1 mg/ml, Invitrogen, cat. núm.: D1306) durante 5
15 minutos a temperatura ambiente antes de probarse mediante
citometría de flujo (Cytek®, Northen Lights™). Los datos
en crudo fueron analizados por FlowJo™ Portal 10 y se
graficaron usando GraphPad Prism 10. Como se muestra en la
Figura 27, los niveles de expresión de hCD79b de las células
20 Ramos y Daudi fueron de más de aproximadamente 4-10 veces
en las células B sanas en las PBMC.

Ejemplo 29. Inmunofenotipificación de PBMC

Para conocer la relación de diversas poblaciones
25 celulares en PBMC, se realizó inmunofenotipado de células.
La sangre humana sana provenía del Stanford Blood Center.

Las PBMC se aislaron con el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Las PBMC se lavaron dos veces con regulador FACS (1× PBS + 2 % BSA +
5 2 mM EDTA). Se sembraron 1×10^5 PBMC en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en V. Después, 50 µl de cóctel de anticuerpos (BV421 CD19 (BD Biosciences, cat. núm.: 562440), BV605 CD11b (BioLegend, cat. núm.: 101237), BV711 CD11 (BD Biosciences, cat. núm.: 563130, FITC CD56
10 (BD Biosciences, cat. núm.: 340410), PE CD8 (BioLegend, cat. núm.: 344706), Percpcy5.5 CD14 (BD Biosciences, cat. núm.: 550787), PEcy7 CD16 (BD Biosciences, cat. núm.: 557744), APC CD3 (BD Biosciences, cat. núm.: 555335), AF700 CD4 (BD Biosciences, cat. núm.: 566318), AF700 HLA-DR (BD
15 Biosciences, cat. núm.: 560743)) se añadió a cada pocillo. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos; después, las células se lavaron dos veces con regulador FACS (después de que se redujo la velocidad de rotación de las células a 1200 rpm durante 5 minutos). Las células se resuspendieron
20 en 100 µl de regulador de Tinción azul de células muertas SYTOX™ (1:1000) y se incubaron durante 20 minutos sobre hielo en la oscuridad. Las células se analizaron con un citómetro Cytek®. La relación de las distintas poblaciones celulares se calculó basado en las distintas células con
25 marcadores de superficie positivos (células B CD19+,

células NK CD56+, monocitos CD14+, células T CD8+, células T CD4+, células DC CD11c+/HLA-DR+).

Tabla 15. Inmunofenotipificación de PBMC de diferentes donantes

5

Donantes	B	NK	Monocito	T CD8	T CD4	DC
D022	25,4 %	23,1 %	28,0 %	2,57 %	7,65 %	5,45 %
D023	6,35 %	35,4 %	11,8 %	13,3 %	24,9 %	1,14 %
D234	13,9 %	25,6 %	11,9 %	7,87 %	22,5 %	3,72 %
D281	3,33 %	9,60 %	26,6 %	6,00 %	32,0 %	0,29 %
D367	13,7 %	16,3 %	20,0 %	29,5 %	9,49 %	0,84 %
D431	9,26 %	12,80 %	8,81 %	19,7 %	39,7 %	1,59 %

Ejemplo 30. Muerte mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de células Ramos por PBMC

Se ensayó la destrucción tumoral mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con PBMC humanas frescas y células Ramos. Se aislaron PBMC humanas frescas a partir de sangre humana sana donada de SBC (Stanford Blood Center) y se usan placas de 96 pocillos de fondo U. Células Ramos teñidas con regulador de tinción CFSE (Invitrogen).

Se añadieron 2×10^4 células Ramos teñidas con CFSE en 50 μ l de medio a cada pocillo designado. Se añadieron 2×10^5 PBMC en 130 μ l de medio a cada pocillo designado. Se añadieron 20 μ l de anticuerpos de prueba diluidos en serie en medio de cultivo completo en cada pocillo designado, y el volumen final total para cada pocillo fue 200 μ l. La placa con células bien mezcladas se incubó a 37 °C con 5 %

de CO₂. Las muestras se recogieron 24 horas después de la incubación. El pellet de células se resuspendió en regulador FACS y se enjuagó dos veces. Las células se tiñeron con la tinción azul de células muertas SYTOX™ y el

5 CD19 conjugado con PE. Las células se analizan con un citómetro Cytek® (limitación de células Ramos vivas: CFSE+ SYTOX- o CD19+CFSE+ SYTOX-). La eficacia de destrucción se calculó como: (% de destrucción = (recuento de células Ramos vivas de control - recuento de células Ramos vivas

10 tratadas)/recuento de Ramos vivas de control). Como se muestra en las **Figuras 28A-28C**, todos los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A demostraron una eficacia superior de destrucción de células Ramos que Mosunetuzumab comercial a las 24 horas, y los anticuerpos biespecíficos

15 CD79b/CLEC5A exhibieron mayor destrucción B endógena que Mosunetuzumab en todas las PBMC de los tres donantes.

Se evaluó la eficacia de la agotamiento de células B malignas mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediante el ensayo de destrucción con

20 estimulación de Ramos. En concreto, se aislaron PBMC frescas a partir de muestras de sangre sana proporcionadas por Stanford Blood Center con centrifugación en gradiente Ficoll-paque. Las células Ramos (diana) se tiñeron primero con CFSE, y después se mezclaron con PBMC (efector) a E: T

25 = 10:1. Después se incubaron las células junto con anticuerpos titulados en una placa de fondo redondo de 96

pocillos durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. La relación de E:T real calculada con monocito: B (células B endógenas más células Ramos) fue 0,5:1, y fue 1,5:1 si se incluyeron células NK como células efectoras. Después de 24 horas, las

5 células se hilaron hacia abajo para análisis de citometría de flujo, y el sobrenadante se recogió para el análisis ELISA de liberación de citocinas. Las muestras celulares se lavaron una vez con PBS, y después se tiñeron con dilución Zombie Aqua™ 1:1000 durante 20 minutos a 4 °C.

10 Después de la tinción, las células se lavaron con PBS una vez, se resuspendieron con regulador de flujo y después se analizaron con un citómetro de flujo Cytex® (Northern light™). % de destrucción de células Ramos = (Células Ramos en el grupo sin tratamiento-células Ramos en el grupo de

15 tratamiento)/células Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 29A-29B** y la tabla siguiente, con respecto al Donante 234, en comparación con el Mosunetuzumab de uso clínico (IC50 fue aproximadamente 0,25 nM), los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con

20 diferentes estructuras todos mostraron un mayor efecto de destrucción de Ramos (con IC50 de aproximadamente 60 % a 80 % mayor). Por ejemplo, la IC50 de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A varió de 0,0047 nM para CD79b/5C7 (2+1 A) FC-optimizado a 0,338 nM para CD79b/5C7

25 (1+1 A) FC-optimizado. Con respecto al Donante 431, la E:T real fue < 1:1 si se calcula con monocito: Células B, y la

E:T= 2:1 con células NK incluidas como células efectoras. Los resultados de la destrucción de PBMC mediante estimulación de Ramos mostraron que, en comparación con Mosunetuzumab (la IC50 fue 0,0069 nM), los anticuerpos

5 biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras mostraron un mayor efecto de destrucción de Ramos (IC50 de aproximadamente 80 % a casi 100 % mayor). Por ejemplo, la IC50 de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A varió

10 de 0,0062 nM para CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado a 0,0329 nM para CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado.

Tabla 16. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Ramos por PBMC (prueba 2)

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
Donante 234	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-optimizado	0,004718
	CD79b/5C7 (1+1 A) Fc-optimizado	0,338
	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,06753
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,02984
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,06394
	Mosunetuzumab	0,2515
	Control negativo	-
Donante 431	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0062
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,0168
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,0155
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,0104
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,0329
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,0253
	Mosunetuzumab	0,0069
	Control negativo	-

15

Para probar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A para matar células Ramos, se configuró un sistema de cocultivo de PBMC humanas con células Ramos. Las PBMC se aislaron de sangre humana sana con el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Las células Ramos se tiñeron con CFSE (Invitrogen). Se añadieron 20 µl de anticuerpos biespecíficos diluidos en serie en medio completo en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U. Se añadieron 2×10^5 PBMC y 2×10^4 células Ramos (relación de E:T = 10:1) en 180 µl de medio de cultivo completo (RPMI1640 + 10 % de FBS) en cada pocillo, respectivamente. La mezcla se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas. Las células se hicieron girar a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet de células se lavó y se resuspendió en regulador FACS, se tiñó y se analizó con un citómetro Cytex®. Los paneles de tinción incluyeron Tinción azul de células muertas SYTOX™ y Brilliant Violet 421™ para Anticuerpo anti-CD19 humano (BV421 CD19). Las células CFSE+ vivas se limitaron como células tumorales supervivientes. La eficacia de destrucción se calcula como: Muerte = (número de células tumorales de control-número de células tumorales tratadas) /número de células tumorales de control. Como se muestra en las **Figuras 30A-30C** y la tabla siguiente, todos los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras todos mostraron un

mayor efecto de destrucción de Ramos a una relación de E:T muy baja.

Tabla 17. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Ramos por PBMC (prueba

5 3)

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
Donante 022	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,1307
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,3335
	Mosunetuzumab	2,386
	Control negativo	-
Donante 281	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,043
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,2798
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,01654
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,01118
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,04524
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,01231
	Mosunetuzumab	2,358
	Control negativo	-
Donante 367	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,06427
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,02953
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,06851
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,0186
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,2899
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,8413
	Mosunetuzumab	0,1058
	Control negativo	-

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A para estimular la secreción de IL-6 en presencia de células Ramos diana (CD79b+). Se incubaron aproximadamente 200.000 PBMC con 20.000 células Ramos (relación E:T de 10:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS

inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de IL-6. Como se muestra en las **Figuras 31A-31B**, los niveles de IL-6 no
5 aumentaron significativamente con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A en presencia de células Ramos diana. No obstante, los niveles de IL-6 aumentaron de manera dependiente de la dosis con Mosunetuzumab comercial. Los resultados sugieren que los anticuerpos biespecíficos
10 CD79b/CLEC5A tienen un mejor perfil de seguridad que Mosunetuzumab.

Para probar la liberación de citocinas en los ensayos de estimulación de Ramos, se recogió el sobrenadante de los ensayos de destrucción con estimulación
15 de Ramos a las 24 horas, la concentración de TNF α en el sobrenadante se midió con kit ELISA (Kit de ELISA no recubierto con TNF alfa humano, Invitrogen, cat. núm.: 88-7346-88). Se ensayaron placas de alta unión de 96 pocillos recubiertas 24 horas con anticuerpo de captura, 25 μ l de
20 muestra a 25 μ l de diluyente reactivo (dilución 2x). Como se muestra en **la Figura 32**, hubo mayor concentración de TNF α liberado en el grupo tratado con Mosunetuzumab, pero en el grupo tratado con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A, la concentración de TNF α se encontraba a
25 nivel bajo o de fondo.

Ejemplo 31. La destrucción mediada por los anticuerpos
biespecíficos CD79b/CLEC5A de las células B endógenas por
las PBMC

Se probó la destrucción tumoral mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de las células B endógenas. Específicamente, se aislaron PBMC humanas frescas a partir de sangre humana sana donada de SBC (Stanford Blood Center) y se usan placas de 96 pocillos de fondo U. Se añadieron 2×10^5 PBMC en 130 μ de medio a cada pocillo designado. Se añadió 20 μ l de anticuerpos de prueba diluidos en serie en medio de cultivo completo en cada pocillo designado, y el volumen final total para cada pocillo fue 200 μ l. La placa con células bien mezcladas se incubó a 37 °C y 5 % de CO₂. Las muestras se recogieron 24 horas después de la incubación. El pellet de células se resuspendió en regulador FACS y se enjuagó dos veces. Las células se tiñeron con la tinción azul de células muertas SYTOX™ y el anticuerpo anti-CD19 conjugado con PE. Las células se analizan con un citómetro Cytex®. % de destrucción de células B endógenas = (Células B endógenas en el grupo sin tratamiento)/Células B endógenas en el grupo de tratamiento)/Células B endógenas en el grupo sin tratamiento $\times 100$. Como se muestra en las **Figuras 33A-33C**, los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A exhibieron una mayor destrucción de células B endógenas que Mosunetuzumab en las PBMC de los tres donantes.

Para probar la eficacia de los anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A para agotar las células B
endógenas, se usaron PBMC humanas sanas. Se aislaron PBMC
frescas a partir de muestras de sangre sana proporcionadas
5 por Stanford Blood Center con centrifugación en gradiente
Ficoll-paque. Se incubaron 2×10^5 /pocillo PBMC junto con
anticuerpos titulados en una placa de fondo redondo de 96
pocillos durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. La E:T
real calculada con monocitos a células B endógenas o
10 monocitos más células NK a células B endógenas varió con
los donantes. Después de 24 horas, las células se giraron
hacia abajo para el análisis de citometría de flujo, y el
sobrenadante se recogió del análisis ELISA de liberación
de citocinas. Las muestras celulares se lavaron una vez con
15 PBS, y después se tiñeron con dilución Zombie Aqua™ 1:1000
durante 20 minutos a 4 °C. Después de la tinción, las
células se lavaron con PBS una vez, y después se tiñeron
con CD19-BV421 (BioLegend, cat. núm.: 302234) durante 30
minutos a 4 °C. Las células teñidas se lavaron con PBS una
20 vez, se resuspendieron con regulador de flujo y después se
analizaron con un citómetro de flujo Cytex® (Northern
light™). % de destrucción de células B endógenas = (Células
B endógenas en el grupo sin tratamiento-Células B endógenas
en el grupo de tratamiento)/Células B endógenas en el grupo
25 sin tratamiento $\times 100$. Como se muestra en las **Figuras 34A-**
34D y la tabla siguiente, para el Donante 023, la E:T fue

2:1 para monocito: Endo B, y el número fue 7:1 si se incluyeron células NK como las células efectoras. El Mosunetuzumab clínicamente usado solo tuvo aproximadamente 65 % de eficacia a 10 nM, mientras que los anticuerpos

5 biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras todos mostraron un mayor efecto de destrucción de células B endógenas de aproximadamente 80 % a 96 %. Con respecto al Donante 234, monocito: las células Endo B (E:T) fueron < 1:1, y la E:T= 3:1 si las células NK se incluyeron como las

10 células efectoras. En comparación con el Mosunetuzumab clínicamente usado (IC50 fue 0,086 nM), los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras todos mostraron mayor efecto de destrucción de células B endógenas de aproximadamente 90 %. Para el Donante 431,

15 monocito: las células Endo B (E:T) fue < 1:1, y la E: T= 2:1 si se calcula como (monocito + NK): Los anticuerpos biespecíficos Endo B. CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras todos mostraron un mayor efecto de destrucción de células B endógenas (de aproximadamente 80 % a 95 %

20 mayor). En el Donante 367 se observaron resultados similares.

Tabla 18. Diferentes acopladores de células mieloides
mediaron la destrucción de las células B endógenas por
las PBMC

25

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
---------	-------------	-----------

Donante 023	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,02306
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,08329
	Mosunetuzumab	229,7
	Control negativo	-
Donante 234	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-optimizado	0,01779
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	004532
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,01559
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,02071
	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,01544
	Mosunetuzumab	0,8647
	Control negativo	-
Donante 431	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,006174
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	001677
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,01546
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,1039
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,03293
	CD79b/5C7 (1+1B) Fc-optimizado	0,02533
	Mosunetuzumab	-
	Control negativo	-
Donante 367	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,006174
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	001677
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,01546
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,1039
	CD79b/5C7 (1+1B) Fc-silenciado	0,03293
	CD79b/5C7 (1+1B) Fc-optimizado	0,02533
	Mosunetuzumab	-
	Control negativo	-

Se probó la destrucción tumoral mediada por anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de las células B endógenas. Específicamente, se aislaron PBMC humanas frescas a partir de sangre humana sana donada de SBC (Stanford Blood Center) y se usan placas de 96 pocillos de fondo U. Se incubaron 2×10^5 /pocillo PBMC junto con anticuerpos titulados en una placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Las

muestras se recogieron 24 horas después de la incubación. El pellet de células se resuspendió en regulador FACS y se enjuagó dos veces. Las células se tiñeron con la tinción azul de células muertas SYTOX™ y el anticuerpo anti-CD19 conjugado con PE. % de destrucción de células B endógenas = (Células B endógenas en el grupo sin tratamiento)/Células B endógenas en el grupo de tratamiento)/Células B endógenas en el grupo sin tratamiento × 100. Los resultados se muestran en las **Figuras 35A-35B**.

10 Para probar la liberación de citocinas de ensayos de destrucción de células B endógenas, se recogió el sobrenadante de los ensayos de destrucción de células B endógenas a las 24 horas, se midió la concentración de TNFα en el sobrenadante con kit de ELISA (Kit ELISA sin recubrimiento para TNF alfa humano, Invitrogen, cat. 15 núm.: 88-7346-88). Se probaron placas de alta unión de 96 pocillos recubiertas 24 horas con anticuerpo de captura, 25 µl de muestra a 25 µl de diluyente reactivo (dilución 2x). Como se muestra en la **Figura 36**, en el grupo tratado 20 con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A, la concentración de TNFα estaba a nivel bajo o de fondo, sugería que los acopladores mieloides eran más seguros que el marcador de banco Mosunetuzumab.

Ejemplo 32. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A
mediaron la destrucción de células Ramos por los
macrófagos M0

Se evaluaron los efectos de los anticuerpos

5 biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras para matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por macrófagos efectores (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados de donantes de PBMC humanas núm. 100, núm. 233, núm. 022, núm. 431, núm. 159 y núm. 161 con Kit de

10 Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días.

15 Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de

20 penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células Ramos se limitaron como

25 CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas

las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en **las Figuras 37A-37F** y la tabla siguiente, todos los acopladores mieloides CD79b/CLEC5A pueden matar de manera más eficiente las células Ramos cancerosas CD79b+.

Tabla 19. Diferentes acopladores de células mieloides mediaron la destrucción de células Ramos por macrófagos

M0

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
Donante 100	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,002
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0008
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,006
Donante 233	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,002
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,003
Donante 022	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,012
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado	0,003
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-optimizado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,003
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,003
Donante 431	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	00014
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,004
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,004

	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,003
Donante 159	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,001
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,001
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,001
Donante 161	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-silenciado	0,0006
	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,0013
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0008
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,001

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras en presencia o ausencia de células Ramos diana.

- 5 Monocitos CD14⁺ (purificados de donantes de PBMC humanas núm. núm. 100, núm. 233, núm. 022 y núm. 431 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de
- 10 factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 células Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con
- 15 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNF α e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems,
- 20 cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con

las instrucciones del fabricante. Como se muestra en las **Figuras 38A-38D**, tanto IL-6 como TNF α se liberaron de los macrófagos solo en presencia de células Ramos diana y anticuerpos CD79b/CLEC5A de manera dependiente de la dosis y a niveles muy bajos, lo que sugiere que los acopladores mieloides son seguros para uso clínico.

Para estimar la eficacia de destrucción de células B cancerosas (Ramos) por macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC (donantes núm. 22461 y núm. 22657) mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por 50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). Después de 7 días, se obtuvieron macrófagos diferenciados monocitos (M0). Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M0 y células Ramos con los acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M0. El anticuerpo biespecífico CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides se diluyó en serie. Las células Ramos se tiñeron primero con CFSE, y después se estimularon en macrófagos M0 (E:T= 5:1, E: T= 2:1, o E:T= 1:1) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Ramos: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpos diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de

incubación, la placa se hizo girar hacia abajo y el sobrenadante se almacenó a -80 °C. Las células se tiñeron con colorante de tinción vive/muerto, y después se procesaron en un citómetro de flujo CytoFLEX LX. El

5 porcentaje de destrucción celular se calculó como: (número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento- número de células tumorales vivas en el grupo de tratamiento) /número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 39A-**

10 **39B**, los acopladores mieloides mostraron potentes efectos de destrucción de células Ramos en diferentes relaciones E:T, incluso a bajas relaciones de E:T (p. ej., E:T= 1:1) in vitro. La destrucción máxima de células tumorales específicas fue aproximadamente 99 % (E:T= 5:1), 95 % (E:T=

15 2:1), 80 % (E:T= 1:1) para Ramos a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción de células diana de manera eficiente a baja E: Relaciones T de macrófagos M0 a células diana.

20 Para estimar la liberación de citocinas de las células B cancerosas (Ramos) que matan a los macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC (donantes núm. 22461 y núm. 22657) Kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin

25 agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por

50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). Después de 7 días, se obtuvieron macrófagos diferenciados monocitos (M0). Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M0 y células Ramos con los
5 acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M0. El anticuerpo biespecífico CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides se diluyó en serie. Las células Ramos se tiñeron primero con CFSE, y después se estimularon en macrófagos M0 (E:T= 5:1, E: T= 2:1, o E:T= 10 1:1) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Ramos: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpo biespecífico CD79b/CLEC5A diluido en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de incubación, la placa se hizo girar
15 hacia abajo, y se recuperó el sobrenadante para el análisis ELISA. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human TNF- α (BioLegend, cat. núm.: 430204) y el kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (BioLegend, cat. núm.: (430504). La absorbancia a 450 nm
20 se midió en 15 minutos mediante un Lector de Absorbancia SpectraMax® (MOLECULAR DEVICES, S/N3052431867). Sin que las células diana (Ramos) se estimularan, los acopladores mieloides no mediaban la liberación de TNF α o IL-6 in vitro. Como se muestra en las **Figuras. 40A-40B**, con células diana
25 (Ramos) estimuladas, los acopladores mieloides mostraron una liberación débil de TNF α e IL-6 en diferentes relaciones

de E:T in vitro. La liberación máxima de TNF α fue menor que 150 pg/ml, mientras que la liberación máxima de IL-6 fue menor que 200 pg/ml a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la
5 destrucción de células diana de manera eficiente, pero inducir una liberación de citocinas muy débil de macrófagos M0 a las células diana.

Se evaluaron los efectos de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras para
10 matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por macrófagos efectores (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados de donantes de PBMC humanas núm. 022 y núm. 0112 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies,
15 cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 7 días. Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron
20 aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Se incubaron aproximadamente 80.000
25 macrófagos con 40.000 CFSE+ Ramos (relación de E:T de 2:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI

completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Se incubaron aproximadamente 60.000 macrófagos con 60.000 CFSE+ Ramos (relación de E:T de 1:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células Ramos se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 41A-41C**, todos los acopladores mieloides pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de

TNF α e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la **Figura 42**, tanto IL-6 como TNF α se encontraban en niveles muy bajos, lo que sugiere que los acopladores mieloides son seguros para uso clínico.

Para saber si los macrófagos M0 activados causan además la automatanza para reducir sus números, analizamos los números de macrófagos M0 para probar su estado. Las células Ramos pasaron por la eliminación de células muertas y después se tiñeron con 0,25 uM de CFSE. El número de macrófagos M0 se mostró en la **Figura 43**, no hubo cambios significativos en los recuentos de macrófagos.

Ejemplo 33. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Daudi por macrófagos M0

Para estimar la eficacia de destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC (donantes núm. 21232, núm. 22657 y núm. 22461) mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por 50 ng/ml de M-CSF (StemCell

Technologies, cat. núm.: 78057). El día 7 se obtuvieron macrófagos M0. Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M0 y células Daudi con los acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M0. Los acopladores de células mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) se diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero con CFSE, después se estimularon en macrófagos M0 (E:T= 5:1, E:T= 2:1, E:T= 1:1, o E:T= 1:2) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Daudi: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de incubación, la placa se hizo girar hacia abajo y el sobrenadante se almacenó a - 80 °C. Las células se tiñeron con colorante de tinción vive/muerto, y después se procesaron en un citómetro de flujo CytoFLEX LX. El porcentaje de destrucción celular se calculó como: (número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento-número de células tumorales vivas en el grupo de tratamiento) /número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento $\times 100$. Como se muestra en las **Figuras 44A-44B**, los acopladores mieloides mostraron potentes efectos de destrucción de células Daudi en macrófagos M0 in vitro en diferentes relaciones de E:T. La destrucción máxima de células tumorales específicas fue de alrededor del 97 %-99 % a E:T= 5:1, 90 %-96 % a E:T= 2:1,

y 60 %-89 % a E:T= 1:1 para las células Daudi a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción de células diana de manera eficiente a baja E: Relaciones T de macrófagos M0 a células diana. Como se muestra en las **Figuras 45A-45B**, los acopladores mieloides mostraron efectos de destrucción de células Daudi potentes y comparables en macrófagos M0 in vitro en diferentes relaciones de E:T. La destrucción máxima de células tumorales específicas fue aproximadamente 99 % (E:T= 5:1), 96 % (E:T= 2:1), 92 % (E:T= 1:1) y 90 % (E:T= 1:2) para las células Daudi a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción celular diana de manera eficiente y comparable a bajas relaciones de E:T de macrófagos M0 a células diana.

Para estimar la liberación de citocinas de la destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en macrófagos M0 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC (donantes núm. 21232, núm. 22657 y núm. 22461) mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por 50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). El día 7 se obtuvieron macrófagos M0. Se incubaron

diferentes relaciones de E:T de macrófagos M0 y células Daudi con los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloide para probar sus funciones en macrófagos M0. Los acopladores de células mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) se diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero con CFSE, después se estimularon en macrófagos M0 (E:T= 5:1, E:T= 2:1, E:T= 1:1, o E:T= 1:2) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Daudi: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de incubación, la placa se hizo girar hacia abajo, y se recuperó el sobrenadante para el análisis ELISA. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human TNF- α (BioLegend, cat. núm.: 430204) y el kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (BioLegend, cat. núm.: 430504). La absorbancia a 450 nm se midió en 15 minutos mediante un Lector de Absorbancia SpectraMax® (MOLECULAR DEVICES, S/N3052431867). Sin que las células diana (Daudi) se estimularan, los acopladores mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) no mostraron liberación de TNF α o IL-6 in vitro. Como se muestra en las **Figuras 46A-46D**, con las células diana (Daudi) estimuladas, los acopladores mieloides mostraron menos liberación de TNF α e IL-6 in vitro. La liberación máxima de TNF α fue menor

que 150 pg/ml, mientras que la liberación máxima de IL-6 fue menor que 200 pg/ml a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción de células diana de manera eficiente, e inducir una liberación de citocinas muy débil de macrófagos M0 a las células diana.

Ejemplo 34. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Ramos por los

10 macrófagos M1

Se evaluaron los efectos de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras para matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por macrófagos efectores (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados de PBMC humanas (donantes núm. 100 y núm. 431) con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) a macrófagos M1 por otras 24 horas (Día 7). Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de

anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytek®. Las células Ramos se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células Ramos CFSE+ en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 47A-47B** y la tabla siguiente, todos los acopladores mieloides pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Tabla 20. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Ramos por los macrófagos M1

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
Donante 100	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0007
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado	0,001
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,001
Donante 431	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0014
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,002

	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,005
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,005
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,005
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,006

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras en presencia o ausencia de células Ramos diana.

5 Monocitos CD14⁺ (purificados de PBMC humanas (donantes núm. 100 y núm. 431) con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de

10 colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) a macrófagos M1 por otras 24 horas (Día 7). Se incubaron aproximadamente 100.000

15 macrófagos con 20.000 células Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para

20 el análisis de citocina. Los niveles de TNF α e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se muestra en las

Figuras 48A-48B, tanto IL-6 como TNF α se liberaron de los macrófagos solo en presencia de Ramos y anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de manera dependiente de la dosis y a niveles bajos, lo que sugiere que acopladores
5 mieloides son seguros para el uso clínico.

Se evaluaron los efectos de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras para matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por macrófagos efectores (CLEC5A+). Monocitos CD14+
10 (purificados de PBMC humanas (donante núm. 022) con Kit de Enriquecimiento de Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat.
15 núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020) a macrófagos M1 por otras 24 horas (Día 7). Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron
20 aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se
25 resuspendieron en 100 μ l de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857)

y analizaron con un citómetro Cytek®. Las células Ramos se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células Ramos CFSE+ en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en la **Figura 49**, todos los acopladores mieloides pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNFα e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la **Figura 50**.

Para saber si los macrófagos M1 activados causan además la automatanza para reducir sus números, analizamos los números de macrófagos M1 para probar su estado. Las células Ramos pasaron por la eliminación de células muertas y después se tiñeron con 0,25 uM de CFSE. El número de

macrófagos se mostró en la **Figura 51**, no hubo cambios significativos en los recuentos de macrófagos M1.

Ejemplo 35. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A

5 mediaron la destrucción de células Daudi por macrófagos M1

Para estimar la eficacia de destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en macrófagos M1 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por 10 50 ng/ml de M-CSF (StemCell, cat. núm.: 78057). En el Día 6, se añadieron el medio completo con 50 ng/ml de M-CSF y 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell, cat. núm.: 78020). El día 7 se obtuvieron macrófagos M1. Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M1 y células Daudi con los 15 acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M1. Los acopladores de células mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) se diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero con CFSE y después se estimularon en macrófagos M1 (E:T= 5:1 o E: T = 20 2:1) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Daudi: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron 25

adicionalmente con anticuerpos biespecíficos CD79b/hCLEC5A diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de incubación, la placa se hizo girar hacia abajo y el sobrenadante se almacenó a -80 °C. Las

5 células se tiñeron con colorante de tinción vive/muerto, y después se procesaron en un citómetro de flujo CytoFLEX LX. El porcentaje de destrucción celular se calculó como: (número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento-número de células tumorales vivas en el grupo

10 de tratamiento) /número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en la **Figura 52**, los acopladores mieloides mostraron potentes efectos de destrucción de células Daudi en diferentes relaciones de E: T, y los acopladores mieloides mostraron una potencia

15 de destrucción de células Daudi comparable en macrófagos M1 in vitro. La destrucción máxima de células tumorales específicas fue de alrededor del 96 % (E:T= 5:1) y del 85 % (E:T= 2:1) para las células Daudi a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden

20 promover la destrucción celular diana de manera eficiente en diferentes relaciones de E:T de macrófagos M1 a células diana.

Para estimar la liberación de citocinas de destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los

25 anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en M1 en diferentes relaciones de E:T,

se aislaron monocitos humanos de PBMC mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por
5 50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). En el Día 6, medios completos con 50 ng/ml de M-CSF y 50 ng/ml de IFN- γ (StemCell Technologies, cat. núm.: 78020). El día 7 se obtuvieron macrófagos M1. Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M1 y células
10 Daudi con los acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M1. Los acopladores de células mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) se diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero con CFSE y después se estimularon en macrófagos M1 (E:T=
15 5:1 o E: T = 2:1) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos fijos de Daudi: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de incubación, la placa se
20 hizo girar hacia abajo, y se recuperó el sobrenadante para el análisis ELISA. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human TNF- α (BioLegend, cat. núm.: 430204) y el kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (BioLegend, cat. núm.: (430504). La
25 absorbancia a 450 nm se midió en 15 minutos mediante un Lector de Absorbancia SpectraMax® (MOLECULAR DEVICES,

S/N3052431867). Sin células diana (Daudi) estimuladas, los acopladores mieloides no mostraron liberación in vitro de TNF α e IL-6. Como se muestra en **la Figura 53**, con las células diana (Daudi) estimuladas, los acopladores mieloides mostraron liberación comparable de TNF α e IL-6 in vitro. La liberación máxima de TNF α fue menor que 1000 pg/ml, mientras que la liberación máxima de IL-6 fue menor que 1600 pg/ml a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción de células diana de manera eficiente, e inducir una liberación de citocinas de macrófagos M1 a las células diana.

Ejemplo 36. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A
mediaron la destrucción de células Ramos por los
macrófagos M2

Se evaluaron los efectos de la valencia de los anticuerpos CD79b/CLEC5A de los acopladores mieloides para matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por células efectoras de macrófagos M2 (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados de donantes de PBMC humanas núm. 100, núm. 233, núm. 022 y núm. 431 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat.

núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024) a macrófagos M2 por otras 24 horas (Día 7). Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células Ramos se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células Ramos CFSE+ en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 54A-54D** y la tabla siguiente, todos los acopladores mieloides con diferentes estructuras pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Tabla 21. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A
mediaron la destrucción de células Ramos por los
macrófagos M2

Donante	Anticuerpos	IC50 (nM)
Donante 100	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,001
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0004
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado	0,001
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,002
Donante 233	CD79b/5C7 (2+2 A) Fc-optimizado	0,003
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,005
Donante 022	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,001
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,006
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-silenciado	0,003
	CD79b/5C7 (2+1 A) Fc-optimizado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,002
Donante 431	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-silenciado	0,0009
	CD79b/5C7 (2+2 B) Fc-optimizado	0,001
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-silenciado	0,002
	CD79b/5C7 (2+1 B) Fc-optimizado	0,001
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-silenciado	0,003
	CD79b/5C7 (1+1 B) Fc-optimizado	0,001

5

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras en presencia o ausencia de células Ramos diana. Monocitos CD14+ (purificados de donantes de PBMC humanas
10 núm. núm. 100, núm. 233, núm. 022 y núm. 431 con Kit de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de

factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024) a
5 macrófagos M2 por otras 24 horas (Día 7). Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 células Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24
10 horas a 37 °C. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNF α e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como se
15 muestra en las **Figuras 55A-55D**, se liberó una pequeña cantidad de IL-6 de los macrófagos M2 sólo en presencia de células Ramos diana y anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A de manera dependiente de la dosis. No hubo ningún cambio en los niveles de TNF α ni en presencia ni en
20 ausencia de células Ramos diana, lo que sugiere que los acopladores mieloides son seguros para su uso clínico.

Se evaluaron los efectos de la valencia de los anticuerpos CD79b/CLEC5A de los acopladores mieloides para matar células Ramos cancerosas diana (CD79b+) por células
25 efectoras de macrófagos M2 (CLEC5A+). Monocitos CD14+ (purificados de donantes núm. 022 de PBMC humanas con Kit

de Enriquecimiento de Monocitos Humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058)) se diferenciaron a macrófagos M0 con 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, 5 StemCell Technologies, cat. núm.: 78057) durante 6 días. El día 6, los macrófagos M0 se polarizaron con 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024) a macrófagos M2 por otras 24 horas (Día 7). Las células Ramos se etiquetaron con CFSE (ThermoFisher, cat. núm.: C34554).

10 Se incubaron aproximadamente 100.000 macrófagos con 20.000 CFSE+ Ramos (relación E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C.

15 Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytex®. Las células Ramos se limitaron como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto

20 de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células Ramos CFSE+ en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+

25 SYTOX- Ramos en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ Ramos en el grupo sin tratamiento

× 100. Como se muestra en la **Figura 56**, todos los acopladores mieloides pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras. Después de la incubación, se recogió el sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNFα e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en la **Figura 57**.

Para saber si los macrófagos M2 activados causan además la automatanza para reducir sus números, analizamos los números de macrófagos M2 para probar su estado. Las células Ramos pasaron por la eliminación de células muertas y después se tiñeron con 0,25 uM de CFSE. El número de macrófagos se mostró en la **Figura 58**, no hubo cambios significativos en los recuentos de macrófagos M2.

Ejemplo 37. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mediaron la destrucción de células Daudi por macrófagos M2

Para estimar la eficacia de destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en macrófagos M2 en diferentes relaciones de E:T,

se aislaron monocitos humanos de PBMC mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por

5 50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). En el Día 6, se añadieron medios completos con 50 ng/ml de M-CSF y 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024). El día 7 se obtuvieron macrófagos M2. Se incubaron diferentes relaciones de E:T

10 de macrófagos M2 y células Daudi con los acopladores de células mieloides para probar sus funciones en macrófagos M2. Los acopladores de células mieloides (anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A) se diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero con CFSE y después se

15 estimularon en macrófagos M2 (E:T= 2:1, E: T= 1:1, o E:T= 1:2) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (recuentos de Daudi fijos: 2×10^4 /pocillo), que se incubaron adicionalmente con anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A diluidos en serie (1 a 3 diluciones a partir de 10 nM).

20 Después de 24 horas de incubación, la placa se hizo girar hacia abajo y el sobrenadante se almacenó a -80 °C. Las células se tiñeron con colorante de tinción vive/muerto, y después se procesaron en un citómetro de flujo CytoFLEX LX. El porcentaje de destrucción celular se calculó como:

25 (número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento-número de células tumorales vivas en el grupo

de tratamiento) /número de células tumorales vivas en el grupo sin tratamiento $\times 100$. Como se muestra en la **Figura 59**, los acopladores mieloides mostraron potentes efectos de destrucción de células Daudi en diferentes relaciones de E:T, y los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A mostraron una potencia de destrucción de células Daudi comparable en macrófagos M2 in vitro. La destrucción máxima de células tumorales específicas fue de alrededor del 97-99 % (E:T= 2:1), 88-96 % (E:T= 1:1) y 67-82 % (E:T= 1:2) para las células Daudi a las 24 horas, lo que indica que los acopladores de células mieloides pueden promover la destrucción celular diana de manera eficiente en diferentes relaciones de E:T de macrófagos M2 a células diana.

Para estimar la liberación de citocinas de destrucción de células B cancerosas (Daudi) de los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A del acoplador de células mieloides en M2 en diferentes relaciones de E:T, se aislaron monocitos humanos de PBMC mediante el kit de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep™ sin agotamiento de CD16 (StemCell Technologies, cat. núm.: 19058). Los monocitos aislados fueron inducidos por 50 ng/ml de M-CSF (StemCell Technologies, cat. núm.: 78057). El día 6, medios completos con 50 ng/ml M-CSF y 25 ng/ml de IL-10 (StemCell Technologies, cat. núm.: 78024). El día 7 se obtuvieron macrófagos M2. Se incubaron diferentes relaciones de E:T de macrófagos M2 y células

Daudi con los acopladores de células mieloides (anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A) para probar sus funciones en
macrófagos M2. Los acopladores de células mieloides se
diluyeron en serie. Las células Daudi se tiñeron primero
5 con CFSE y después se estimularon en macrófagos M2 (E:T=
2:1, E: T= 1:1, o E:T= 1:2) en una placa de fondo redondo
de 96 pocillos (recuentos de Daudi fijos: 2×10^4 /pocillo),
que se incubaron adicionalmente con anticuerpos
bienespecíficos CD79b/CLEC5A diluidos en serie (1 a 3
10 diluciones a partir de 10 nM). Después de 24 horas de
incubación, la placa se hizo girar hacia abajo, y se
recuperó el sobrenadante para el análisis ELISA. El ELISA
se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit ELISA
MAX™ Deluxe Set Human TNF- α (BioLegend, cat. núm.: 430204)
15 y el kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-6 (BioLegend, cat.
núm.: 430504). La absorbancia a 450 nm se midió en 15
minutos mediante un Lector de Absorbancia SpectraMax®
(MOLECULAR DEVICES, S/N3052431867). Como se muestra en la
Figura 60, con las células diana (Daudi) estimuladas, los
20 acopladores mieloides mostraron liberación comparable de
TNF α e IL-6 in vitro. La liberación máxima de TNF α fue menor
que 150 pg/ml, mientras que la liberación máxima de IL-6
fue menor que 200 pg/ml a las 24 horas, lo que indica que
los acopladores de células mieloides pueden promover la
25 destrucción de células diana de manera eficiente, e inducir

una liberación de citocina muy baja de macrófagos M2 a las células diana.

Ejemplo 38. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A

5 mediaron la destrucción de células B por monocitos

Se evaluaron los efectos de la valencia de los anticuerpos CD79b/CLEC5A de los acopladores mieloides para matar las células B cancerosas diana (CD79b+) por células de monocitos efectores (CLEC5A+). Donantes de monocitos
10 frescos núm. 131 y núm. 445 aislados de PBMC usando el kit de enriquecimiento de monocitos humanos StemCell sin agotamiento de CD16, se dejaron reposar durante 1 hora antes de configurar el ensayo. Se incubaron aproximadamente 100.000 monocitos con 20.000 células B CFSE+ (relación de
15 E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul
20 de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytek®. Las células B fueron compuestas como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El
25 porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células CFSE+ B en el grupo

sin tratamiento - número absoluto de células CFSE+ SYTOX- B en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ B en el grupo sin tratamiento × 100. Como se muestra en las **Figuras 61A-61B**, todos los
5 acopladores mieloides pueden matar eficientemente células Ramos cancerosas CD79b+.

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras. Después de la incubación, se recogió el
10 sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNFα e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en las **Figuras 62A-62B**.

15 Para saber si los monocitos activados causan además la automatanza para reducir su número, analizamos los números de monocitos para probar su estado. Las células B corrieron a través de la eliminación de células muertas después se tiñeron con 0,25 uM de CFSE. El número de
20 monocitos se mostró en **las Figuras 63A-63B**, no hubo cambios significativos en los recuentos de monocitos.

Ejemplo 39. Los anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A
mediaron la destrucción de células B por monocitos

25 Se evaluaron los efectos de la valencia de los anticuerpos CD79b/CLEC5A de los acopladores mieloides para

matar las células B cancerosas diana (CD79b+) por células de monocitos efectores (CLEC5A+). Donantes de monocitos frescos núm. 131 y núm. 445 aislados de PBMC usando el kit de enriquecimiento de monocitos humanos StemCell sin agotamiento de CD16, se dejaron reposar durante 1 hora antes de configurar el ensayo. Se incubaron aproximadamente 100.000 momocitos con 20.000 células B CFSE+ (relación de E:T de 5:1) en presencia de anticuerpos diluidos en serie en medio RPMI completo (con 10 % de FBS inactivado por calor y 5 % de penicilina/estreptomicina) durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se resuspendieron en 100 µl de regulador FACS con Tinción azul de células muertas SYTOX™ (ThermoFisher, cat. núm.: S34857) y analizaron con un citómetro Cytek®. Las células B fueron compuestas como CFSE+ por FACS, y se obtuvo el recuento celular absoluto de células CFSE+ recolectando un volumen fijo para todas las condiciones de tratamiento. El porcentaje de destrucción de células diana se calculó como: (número absoluto de número de células CFSE+ B en el grupo sin tratamiento - número absoluto de número de células CFSE+ SYTOX- B en el grupo de tratamiento)/número absoluto de número de células CFSE+ B en el grupo sin tratamiento × 100. Los resultados se muestran en las **Figuras 64A-64B**.

Se evaluó la liberación de citocinas de anticuerpos biespecíficos CD79b/CLEC5A con diferentes estructuras. Después de la incubación, se recogió el

sobrenadante para el análisis de citocina. Los niveles de TNF α e IL-6 en sobrenadantes se midieron usando kits ELISA (R&D Systems, cat. núm.: DY206 y DY210, respectivamente) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se muestran en las **Figuras 65A-65B**.

Para saber si los monocitos activados causan además la automatanza para reducir su número, analizamos los números de monocitos para probar su estado. Las células B corrieron a través de la eliminación de células muertas después se tiñeron con 0,25 uM de CFSE. El número de monocitos se mostró en **las Figuras 66A-66B**, no hubo cambios significativos en los recuentos de monocitos.

Las secuencias analizadas en la descripción se enumeran en la siguiente tabla.

Tabla 22. Algunas de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción.

Sec. con núm. de ident.	Descripción	Secuencia
1	CLEC5A humana	MNWHMIIISGLIVVLKVVGMTLFLLYFPQIFNKSNDGFTTTR SYGTVC PKDWEFYQARCFLLSTSESSWNESRDFCKGKGSTLA IVNTPEKLKFLQDITDAEKYFIGLIYHREEKRWWINNSVFN GNVTNQNFNCATIGLTKTFDAASCDISYRRICEKNAK
2	CLEC5A de ratón	MNWHMIIISGLIVVVIKVVGMTFFLLYFPQVFGKSNDGFVPTE SYGTTSVQNVSQIFGRNDESTMPTRSYGTVCPRNWDFHQKC FFFSFSESPWKDSMDYCATQGSTLAIVNTPEKLKYLQDIAGI ENYFIGLVRQPGEKKRWWINNSVFNGNVTNQDNFDCVTIGL TKTYDAASCEVS YRWICEMNAK
3	3A7 HCDR1 (Kabat)	GMYWIC
4	3A7 HCDR1 (Chothia)	GFSFSGMY
5	3A7 HCDR2 (Kabat)	CIYTGSTTGYASWAKG

6	3A7 HCDR2 (Chothia)	YTGSST
7	3A7 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	PYGDSSHYRGLNL
8	3A7 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASQRINNYLS
9	3A7 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	GAATLAS
10	3A7 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QCTYGIPSSNYG
11	ch3A7 VH	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSGMYWICWVRQAPG KGLEWIIACIYTGSSSTGYASWAKGRFTISKTSSTVTLQMTS LTAADTATHFCASPYGDSSHYRGLNLWGPGTLVTVSS
12	ch3A7 VL	AVVMTQTPASVEAAVGGTVTINCQASQRINNYLSWFQQKPGQ PPKLLIYGAATLASGVPSRFKSGSGTEYTLTISDLEPADAA TYYCQCTYGIPSSNYGFGGGTEVVVK
13	5C7 HCDR1 (Kabat)	RSSYMC
14	5C7 HCDR1 (Chothia)	GFSFSRSS
15	5C7 HCDR2 (Kabat)	CLSVGDGHYYASWAKG
16	5C7 HCDR2 (Chothia)	SVGDGH
17	5C7 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	APSYSGDGGHGYDL
18	5C7 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASESVDRNNRLA
19	5C7 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	TTSTLAS
20	5C7 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	AGYRGAHTDGDA
21	ch5C7 VH	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPG KGLEWIGCLSVGDGHYYASWAKGRFTISKTSSTVTLQMTS LTAADTATYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGPGTLVTVSS
22	ch5C7 VL	AIVMTQTPSSKSVPGDTVTINCQASESVDRNNRLAWFQQKP GQPPKLLIYTTSTLASGVPSRFKSGSGTHFTLTISDVVPDD AATYYCAGYRGAHTDGDAFGGGTEVVVK
23	6A5 HCDR1 (Kabat)	SSYYMC
24	6A5 HCDR1	GFSFSSSY

	(Chothia)	
25	6A5 HCDR2 (Kabat)	CIYSSSGRTWYATWVNG
26	6A5 HCDR2 (Chothia)	YSSSGR
27	6A5 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	SYAGYGGYGYAYFNL
28	6A5 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASEDIYSSLA
29	6A5 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DASTLAS
30	6A5 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QNYDSTGSGYGAA
31	ch6A5 VH	QQQLEESGGGLVKPGGTLTLTCTASGFSFSSSYMCWVRQAP GKGLELIACIYSSSGRTWYATWVNGRFTISRSTSLNTVDLKM TSLTAADTATYFCARSYAGYGGYGYAYFNLWGPGTLVTVSS
32	ch6A5 VL	DIVMTQTPASVEAGVGGTVTIKCQASEDIYSSLAWYQQKAGQ RPKLLIYDASTLASGVPSRFKSGSGSGTEYTLTISGVQPDDAA TYYCQNYDSTGSGYGAAFGGGTEVVVK
33	6G9 HCDR1 (Kabat)	SNKYM
34	6G9 HCDR1 (Chothia)	GFSFTSNK
35	6G9 HCDR2 (Kabat)	CIYVGDGNTYYASWAKG
36	6G9 HCDR2 (Chothia)	YVGDGN
37	6G9 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	GGDYSIGGGGFASNL
38	6G9 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASESISNFLA
39	6G9 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	RASTLAS
40	6G9 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QSYYGTSSTGHN
41	ch6G9 VH	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFTSNKYMCMWVRQAPG KGPEWIIACIYVGDGNTYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTS LTVADTATYFCARGGDYSIGGGGFASNLWGPGTLVTVSS
42	ch6G9 VL	AFELTQTPSSVEAAVGGTVTINCQASESISNFLAWYRQKPGQ PPKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSGSGTEFTLTISDLEPADGA SYCQSYYGTSSTGHNVEFGGGTEVVVK

43	7G10 HCDR1 (Kabat)	SGYDMC
44	7G10 HCDR1 (Chothia)	GFSFSSGY
45	7G10 HCDR2 (Kabat)	CIYGGRSDNVYYARWAKG
46	7G10 HCDR2 (Chothia)	YGGRSDN
47	7G10 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	DYLYRGYIGGGYGRSNL
48	7G10 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RASEDIENCLA
49	7G10 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	QASKLPS
50	7G10 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QNPDYMRNTDNL
51	ch7G10 VH	QQQLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQAP GKGLEWIAICIYGGRSDNVYYARWAKGRFTISKTSSTTVTLQM TSLTAADTATYFCARDYLYRGYIGGGYGRSNLWGPGLVTVS S
52	ch7G10 VL	DVVMTQTPASVSAAVGGTVTINCRASEDIENCLAWYQQKPGQ PPKLLIYQASKLPSGVPSRFSGSGSGTEYTLTISDLEPDDGA TYYCQNPDYMRNTDNLFGGGTEVVVK
53	9E11 HCDR1 (Kabat)	NYYMC
54	9E11 HCDR1 (Chothia)	GFDLNNYY
55	9E11 HCDR2 (Kabat)	CTHAGSSSSSYARWAKG
56	9E11 HCDR2 (Chothia)	HAGSSSS
57	9E11 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	HDRDYDDMDL
58	9E11 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASQSIEYGYS
59	9E11 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	YASKLAS
60	9E11 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	LYGYFDDYSGAA

61	ch9E11 VH	QSLEESGGGLVQPEGSLTLTCTASGFDLNNYYMCWVRQAPG KGLEWIACTHAGSSSSSYARWAKGRFTISKTSSTVTQLQMT SLTAADTATYFCARHDRDYDDMDLWGPGLVTVSS
62	ch9E11 VL	NIVMTQTTSPVSAVVGGTITINCQASQSIIEYGYLSWYQQKPG QPPKLLIFYASKLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQPDDA ATYFCLYGYFDDYSGAAGGGTEVVVK
63	13E6 HCDR1 (Kabat)	SSYWLC
64	13E6 HCDR1 (Chothia)	GFSFSSSY
65	13E6 HCDR2 (Kabat)	CIYGGSSRGTYIASWAKG
66	13E6 HCDR2 (Chothia)	YGGSSRG
67	13E6 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	HTYTYPRFSPYFNL
68	13E6 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASEDIESSLA
69	13E6 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DASDLES
70	13E6 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QSAYYTGADNT
71	ch13E6 VH	QSLEESGGDLVKPGGTLTLTCTASGFSFSSSYWLCWVRQAPG KGLEWIACTIYGGSSRGTYIASWAKGRFTISKTSSTVTQLQMT SLTAADTATYFCASHTYTYPRFSPYFNLWGPGLVSVSS
72	ch13E6 VL	AFEMTQTPASVSPAVGGTVSINCQASEDIESSLAWYQQKPGQ PPKLLIYDASDLESGVPSRFKSGSGTEYTLTISGVQPADAA TYFCQSAYYTGADNTFSGGTEVVVK
73	14A2 HCDR1 (Kabat)	SYYMC
74	14A2 HCDR1 (Chothia)	GFTLSSYY
75	14A2 HCDR2 (Kabat)	CIYAGSSGTTVYASWAKG
76	14A2 HCDR2 (Chothia)	YAGSSGT
77	14A2 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	KLGDVGYGHTTYFNL
78	14A2 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	QASQNIYSTLA
79	14A2 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DASDLAS

80	14A2 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QTYYDSGSDDLNA
81	ch14A2 VH	QSLEESGGGLVKPEGSLTLTCKASGFTLSSYYMCWVRQAPG KGLEWIACIYAGSSGTTVYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMT SLTAADTATYLCARKLGDVGYGHTTYFNLWGPGLTVTVSS
82	ch14A2 VL	ALVMTQTPSSVSAAVGGTVTIKCQASQNIYSTLAWYQQKPGQ PPKLLMFDASDLASGVPSRFKSGSGSTEYTLTISDLEPADAA TYFCQTYYDSGSDDLNAFGGGTEVVVK
83	h3A7 VH	EQQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSGMYWICWVRQAP GKLEWIACIYTGSSSTGYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCASPYGDSSHYRGLNLWGPGLTVTVSS
84	h3A7 VL	DVQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQRINNYLSWFQQKPGK PPKLLIYGAATLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVA TYYCQCTYGIPISSNYGFGGGTKVEIK
85	h5C7 VH	EQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRSSYMCWVRQAP GKCLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQM NSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS
86	h5C7 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKP GKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYYCAGYRGAHTDGAFGCGTKVEIK
87	h6A5 VH	EQQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFSSSYMCWVRQAP GKGLELIACIYSSSGRTWYATWVNGRFTISRDTSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCARSYAGYGGYAYFNLWGPGLTVTVSS
88	h6A5 VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCQASEDIYSSLAWYQQKPGQ RPRLLIYDASTLASGVPARFSGSGSGTEYTLTISSLQSEDF VYYCQNYDSTGSGYGAAFGGGTKVEIK
89	h7G10 VH	EQQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSGYDMCWVRQAP GKLEWIACIYGGSRDNVYARWAKGRFTISKDSSTNTVFLQ MNSLRAEDTAVYFCARDYLYRGYIGGGYGRSNLWGPGLTVTV SS
90	h7G10 VL	DVQMTQSPSSVSASVGRVTITCRASEDIENCLAWYQQKPGK PPKLLIYQASKLPSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCQNPDMRNTDNLFGGGTKVEIK
91	h13E6 VH	EQQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWLCWVRQAP GKLEWIACIYGGSSRGTTYASWAKGRFTISKDSSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYFCASHTYTYPRFSPYFNLWGPGLTVTVSS
92	h13E6 VL	EFVMTQSPATLSVSPGERATLSCQASEDISSLAWYQQKPGQ PPRLLIYDASDLSEGVPARFSGSGSGTEYTLTISSLQSEDF VYFCQSAYYTGADNTFGGGTKVEIK
93	DX244 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFTIYAMNWKQAPG KGLEWMGWINTDTGEPTYADDFKGRFAFSLETASTAYLQIN NLKNEDMATYFCARSSEVFYDYRFDYWGQGTALTVSS
94	DX244 VL	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSSLNLWQQEPDG TIKRLIYATSNLDSGVPKRFSRSGSDYSLTISSESEDFV HYICLQYASSPFTFGSGTKLEIKR
95	IgG1 humana Fc- silvestre	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	IgG1 humana Fc- silenciado	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF

		PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	IgG1 humana Fc- optimizado	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPELLAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	CL kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
99	Enlazador	(GGGGS) _n
100	HER2 HCDR1 (Kabat)	DTYIH
101	HER2 HCDR1 (Chothia)	GFNIKDT
102	HER2 HCDR2 (Kabat)	RIYPTNGYTRYADSVKG
103	HER2 HCDR2 (Chothia)	YPTNGY
104	HER2 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	WGGDGFYAMDY
105	HER2 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RASQDVNTAVA
106	HER2 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	SASFLYS
107	HER2 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QQHYTTPPT
108	HER2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSS
109	HER2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTITSSLPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
110	HER2/3A7 (1+1A) Fc- silenciado H1 (Ojal HER2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHRTQKSLSLSPGK

111	HER2/3A7 (1+1A) Fc-silenciado H2 (Botón 3A7)	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSGMYWICWVRQAPG KGLEWIIACIYTGSSSTGYASWAKGRFTISKTSSTVTLMQTS LTAADTATHFCASPYGDS SHYRGLNLWGPGTLVTVSSRTVAA PSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC DKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	HER2/3A7 (1+1A) Fc-silenciado L1 (HER2)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
113	HER2/3A7 (1+1A) Fc-silenciado L2 (3A7)	AVVMTQTPASVEAAVGGTVTINCQASQRINNYLSWFQQKPGQ PPKLLIYGATLASGVPSRFGSGSGTEYTLTISDLEPADAA TYQCQTYGIPSSNYGFGGTEVVVKSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK EPKSC
114	HER2/5C7 (1+1A) Fc-silenciado H1 (Ojal HER2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNV FSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPGK
115	HER2/5C7 (1+1A) Fc-silenciado H2 (Botón 5C7)	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPG KGLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKTSSTVTLMQTR LTAADTATYFCARAPSYSGDGGHYDLWGPGTLVTVSSRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC DKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNRYTQKSLSLSPGK
116	HER2/5C7 (1+1A) Fc-silenciado L1 (HER2)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
117	HER2/5C7 (1+1A) Fc-silenciado L2 (5C7)	AIVMTQTPSSKSVPGDTVTINCQASESVDRNNRLAWFQQKP GQPPKLLIYTTSTLASGVPSRFGSGSGTHFTLTISDVVPDD AATYYCAGYRGAHTDGDAGFGGTEVVVKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC
118	HER2/3A7 (2+2A) Fc-silenciado H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPKPKD

		TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	HER2/3A7 (2+2A) Fc-silenciado L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGSGGGGSGGGGSAVMTQTPASVEAAVGGTVTINC QASQRINNYLSWFGQKPGQPPKLLIYGAAATLASGVPSRFGKS GSGTEYTLTISDLEPADAATYYCQCTYGIPSSNYGFGGGTEV VVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQLEESGGDLVKPGASLTL TCTASGFSFSGMYWICWVRQAPGKLEWIAICIYTGSSSTGYA SWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATHFCASPYGDSS HYRGLNLWGPGLTVTVSS
120	HER2/5C7 (2+2A) Fc-silenciado H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	HER2/5C7 (2+2A) Fc-silenciado L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGSGGGGSGGGGSAIVMTQTPSSKSVPGDVTIN QASESVDRNNRLAWFQQKPGQPPKLLIYTTSTLASGVPSRFK GSGSGTHFTLTISDVVPDDAATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGT EVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQLEESGGDLVKPGASL TLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTY YASWAKGRFTISKTSSTSVTLQMTRLTAADTATYFCARAPSY SGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS
122	HER2/5C7 (2+2A) Fc-optimizado H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	HER2/5C7 (2+2A) Fc-optimizado L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGSGGGGSGGGGSAIVMTQTPSSKSVPGDVTIN QASESVDRNNRLAWFQQKPGQPPKLLIYTTSTLASGVPSRFK GSGSGTHFTLTISDVVPDDAATYYCAGYRGAHTDGDAGCGT EVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQLEESGGDLVKPGASL TLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTY YASWAKGRFTISKTSSTSVTLQMTRLTAADTATYFCARAPSY SGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS

124	HER2 Fc-silenciado H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
125	HER2 Fc-silenciado L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
126	EGFR1 HCDR1 (Kabat)	TYGMH
127	EGFR1 HCDR1 (Chothia)	GFTFSTY
128	EGFR1 HCDR2 (Kabat)	VIWDDGSYKYYGDSVKG
129	EGFR1 HCDR2 (Chothia)	WDDGSY
130	EGFR1 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	DGITMVRGVMKDYFDY
131	EGFR1 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RASQDISSALV
132	EGFR1 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DASSLES
133	EGFR1 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QQFNSYPLT
134	EGFR1 VH	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSS
135	EGFR1 VL	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSALVWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIK
136	EGFR2 HCDR1 (Kabat)	NYYIY
137	EGFR2 HCDR1 (Chothia)	GYTFTNY
138	EGFR2 HCDR2 (Kabat)	GINPTSGGSNFNEKFKT
139	EGFR2 HCDR2 (Chothia)	NPTSGG
140	EGFR2 HCDR3	QGLWFDS DGRGFDF

	(Kabat) (Chothia)	
141	EGFR2 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RSSQNIVHSNGNTYLD
142	EGFR2 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	KVSNRFS
143	EGFR2 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	FQYSHVPWT
144	EGFR2 VH	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPG QGLEWIGGINPTSGGSNFKTRVTITADESSTAYMELS SLRSEDATFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGTTTVTVSS
145	EGFR2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRSSQNIVHSNGNTYLDWYQ QTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQ PEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKLEIK
146	EGFR1/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFTSTYGMHWVRQAPG KGLEWVAWIWDDGSYKYYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGITMVRGVMKDYFDYWGQGLTVTVSSA STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PLPEEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
147	EGFR1/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	AIQLTQSPSSLSASVGRVITICRASQDISSALVWYQQKPGK APKLLIYDASSLESGVPSRFSGSESGTDFTLTISSLPEDFA TYCQQFNSYPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECCGGGSGGGGSGGGGSAIVMTQTPSSKSVPGDVTINC QASESVDRNNRLAWFQQKPGQPPKLLIYTTSTLASGVSRFK GSGSGTHFTLTISDVVPDDAATYYCAGYRGAHTDGDAGCGT EVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGQSLEESGGDLVKGASL TLTCTASGFSFSRSMCWVRQAPGKCLEWIGCLSVGDGHTY YASWAKGRFTISKTSSTSVTLQMTRLTAADTATYFCARAPSY SGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS
148	EGFR2/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQAPG QGLEWIGGINPTSGGSNFKTRVTITADESSTAYMELS SLRSEDATFYFCTRQGLWFDSDGRGDFWQGTTTVTVSSAST KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPL PEEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
149	EGFR2/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRSSQNIVHSNGNTYLDWYQ QTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQ PEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGSGGGGSGGGGSAIVMTQTPSSKSVPGDT VTINCQASESVDRNNRLAWFQQKPGQPPKLLIYTTSTLASGV PSRFKSGSGTHFTLTISDVVPDDAATYYCAGYRGAHTDGDAG FCGTEVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGQSLEESGGDLVK

		PGASLTLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKCLEWIGCLSVG DGHTYYASWAKGRFTISKTSSTSVTLQMTRLTAADTATYFCA RAPSYSYSGDGGHGYDLWGPGTLVTVSS
150	HCDR1 EpCAM (Kabat)	NYLIE
151	HCDR1 EpCAM (Chothia)	GYAFTNY
152	HCDR2 EpCAM (Kabat)	VINPGSGGTNYNEKFKG
153	HCDR2 EpCAM (Chothia)	NPGSGG
154	HCDR3 EpCAM (Kabat) (Chothia)	DGPWFAY
155	LCDR1 EpCAM (Kabat) (Chothia)	KASENVVTYVS
156	LCDR2 EpCAM (Kabat) (Chothia)	GASNRYT
157	LCDR3 EpCAM (Kabat) (Chothia)	GQGYSPYT
158	EpCAM VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPG QGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLS SLTSDDSAVYFCARDGPWFAYWGQGTLLVTVSA
159	EpCAM VL	NI VMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQ SPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLA DYHCGQGYSPYTFGGGKLEIK
160	EpCAM/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPG QGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLS SLTSDDSAVYFCARDGPWFAYWGQGTLLVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPLPEEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
161	EpCAM/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	NI VMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTYVSWYQQKPEQ SPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLA DYHCGQGYSPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECCGGGSGGGGSGGGGSAIVMTQTTPSSKSVPVGDVTINC QASESVDRNNRLAWFQQKPGQPPLLIYTTSTLASGVPSRFK GSGSGTHFTLTISDVVPDDAATYYCAGYRGAHTDGAFAFCGT EVVVKGGGSGGGGSGGGGSGGGGQSLEESGGDLVKPGASL TLTCTASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKCLEWIGCLSVGDGHTY YASWAKGRFTISKTSSTSVTLQMTRLTAADTATYFCARAPSY SGDGGHGYDLWGPGTLVTVSS
162	EpCAM Fc-optimizado H	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPG QGLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLS SLTSDDSAVYFCARDGPWFAYWGQGTLLVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

		FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPELLAGPSVFLFPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
163	EpCAM Fc-optimizado L	NI VMTQSPKMSMSVGERVTLTCKASENVVITYVSWYQQKPEQ SPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLA DYHCGQGYSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
164	GPRC5D HCDR1 (Kabat)	GYTMN
165	GPRC5D HCDR1 (Chothia)	GYSFTGY
166	GPRC5D HCDR2 (Kabat)	LINPYNSDTNYAQKLQG
167	GPRC5D HCDR2 (Chothia)	NPYNSD
168	GPRC5D HCDR3 (Kabat) (Chothia)	VALRVALDY
169	GPRC5D LCDR1 (Kabat) (Chothia)	KASQNVATHVG
170	GPRC5D LCDR2 (Kabat) (Chothia)	SASYRYS
171	GPRC5D LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QQYNRYPYT
172	GPRC5D VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPG QGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLTVTVSS
173	GPRC5D VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVATHVGWYQQKPGK APKRLIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFA TYYCQQYNRYPYTFGGGTKLEIK
174	GPRC5D/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPG QGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPELLAGPSVFLFPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
175	GPRC5D/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVATHVGWYQQKPGK APKRLIYSASYRYSYGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFA TYYCQQYNRYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITC

		QASESVDRNNRLAWFQQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTITISLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGFCGT KVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFSSFRSSSYMCMWRQAPGKCLEWIGCLSVGDGHT YYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAP SYSGDGGHGYDLWGPGLVTVSS
176	BCMA HCDR1 (Kabat)	SGSYFWG
177	BCMA HCDR1 (Chothia)	GGSISSGSY
178	BCMA HCDR2 (Kabat)	SIYYSGITYYNPSLKS
179	BCMA HCDR2 (Chothia)	YYSGI
180	BCMA HCDR3 (Kabat) (Chothia)	HDGAVAGLFDY
181	BCMA LCDR1 (Kabat) (Chothia)	GGNNIGSKSVH
182	BCMA LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DDSDRPS
183	BCMA LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QVWDSSSDHVV
184	BCMA VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGLTVTVSS
185	BCMA VL	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQA PVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAV YYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQP
186	BCMA/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
187	BCMA/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQA PVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAV YYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASESVDRNNRLAWFQQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTITISLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGFCGT KVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFSSFRSSSYMCMWRQAPGKCLEWIGCLSVGDGHT YYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAP SYSGDGGHGYDLWGPGLVTVSS
188	CD38 HCDR1	SFAMS

	(Kabat)	
189	CD38 HCDR1 (Chothia)	GFTFNSF
190	CD38 HCDR2 (Kabat)	AISGSGGGTTYADSVKG
191	CD38 HCDR2 (Chothia)	SGSGGG
192	CD38 HCDR3 (Kabat) (Chothia)	DKILWFGEPVFDY
193	CD38 LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RASQSVSSYLA
194	CD38 LCDR2 (Kabat) (Chothia)	DASNRAT
195	CD38 LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QQRSNWPPPT
196	CD38 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKDILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSS
197	CD38 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRSNWPPPTFGQGTKVEIK
198	CD38/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYFCAKDILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELAGPSVFLFPPKPK KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLP EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
199	CD38/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQQRSNWPPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVITITC QASESVDRNNRLAWFQQKPGKPKLLIYTTSTLASGVPSRFS SGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGFCGT KVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGS LRLSCAASGFSFRRSSYMCWVRQAPGKCLEWIGCLSVGDGHT YYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAP SYSGDGGHGYDLWGPGTLVTVSS
200	CD79b HCDR1 (Kabat)	IDYWIS
201	CD79b HCDR1 (Chothia)	GFTINIDY
202	CD79b HCDR2 (Kabat)	IIDPGDGTTFYFAIWVSG

203	CD79b HCDR2 (Chothia)	DPGDGT
204	CD79b HCDR3 (Kabat) (Chothia)	EFSASAYQYDL
205	CD79b LCDR1 (Kabat) (Chothia)	RASEDIENYLA
206	CD79b LCDR2 (Kabat) (Chothia)	RASTLSS
207	CD79b LCDR3 (Kabat) (Chothia)	QQGYRNSNVDNP
208	CD79b VH	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGTLVTVSS
209	CD79b VL	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGTKVEIK
210	CD79b/5C7 (1+1A) Fc- silenciado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFPY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
211	CD79b/5C7 (1+1A) Fc- silenciado H2 (Botón 5C7)	EQQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFSFSSSYMCWVRQAP GKGLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQM NSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGPGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
212	CD79b/5C7 (1+1A) Fc- silenciado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
213	CD79b/5C7 (1+1A) Fc- silenciado L2 (5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKP GKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED VATYYCAGYRGAHTDGDFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
214	CD79b/5C7 (1+1B) Fc- silenciado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

		SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK
215	CD79b/5C7 (1+1B) Fc- silenciado H2 (Botón 5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESVDRNNRLAWFQQKP GKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGKVEIKGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFRSSYMC WVRQAPGKGLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKN SVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWPGTTLV TVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
216	CD79b/5C7 (1+1B) Fc- silenciado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
217	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- silenciado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGIIDPGDGTTFYAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWPGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDGGGSGGGGSGGGGSEQQLVETGGGLI QPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAPGKGLEWIGIIDP GDGTTFYAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF CVREFSASAYQYDLWPGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNRTQKSLSLSPGK
218	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- silenciado H2 (Botón 5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESVDRNNRLAWFQQKP GKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGKVEIKGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFRSSYMC WVRQAPGKGLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKN SVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWPGTTLV TVSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
219	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- silenciado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
220	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- silenciado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGIIDPGDGTTFYAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWPGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

		SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHRTQKSLSLSPGK
221	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- silenciado H2 (Botón CD79b-5C7)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGIIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASESVDRNRLAWF QQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCAGYRGAHTDGAFAFGGKTKVEIKGGGSGGGGS GGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRS SYMCWVRQAPGKGLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKD SAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGP GTLVTVSS
222	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- silenciado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
223	CD79b/5C7 (2+2A) Fc- silenciado H	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGIIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
224	CD79b/5C7 (2+2A) Fc- silenciado L	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF VYYCQQGYRNSNVDPFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCQASESVDRNRLAWFQQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGAFA GGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKGLEWIGCLSVGD GHTYYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCA RAPSYSGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS
225	CD79b/5C7 (2+2B) Fc- silenciado H	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGIIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG

		GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKPGKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWPGTGLVTVSS
226	CD79b/5C7 (2+2B) Fc-silenciado L	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQPPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
227	CD79b/5C7 (1+1A) Fc-optimizado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAPGKLEWIGI IIDPGDGTTFYAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWPGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
228	CD79b/5C7 (1+1A) Fc-optimizado H2 (Botón 5C7)	EQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRSSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWPGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
229	CD79b/5C7 (1+1A) Fc-optimizado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQPPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDFAVYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
230	CD79b/5C7 (1+1A) Fc-optimizado L2 (5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKPGKPKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
231	CD79b/5C7 (1+1B) Fc-optimizado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAPGKLEWIGI IIDPGDGTTFYAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWPGTGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
232	CD79b/5C7 (1+1B) Fc-optimizado H2 (Botón 5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKPGKPKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGGGGKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDSAKN

		SVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGPGLTV TVSSDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
233	CD79b/5C7 (1+1B) Fc- optimizado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
234	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- optimizado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDGGGSGGGGSGGGGSEQQLVETGGGLI QPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAPGKGLEWIGI IDP GDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYF CVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
235	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- optimizado H2 (Botón 5C7)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASESVDRNNRLAWFQQKP GKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLSQPED VATYYCAGYRGAHTDGAFAFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGG SGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRSSYMC WVRQAPGKGLEWIGLSVGDGHTYASWAKGRFTISKDSAKN SVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGPGLTV TVSSDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTI SKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	CD79b/5C7 (2+1A) Fc- optimizado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLSQSEDF VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
237	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- optimizado H1 (Ojal CD79b)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
238	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- optimizado H2 (Botón CD79b-5C7)	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKGLEWIGI IDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP

		SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLVCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASESVDRNNRLAWF QQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGFGGKVEIKGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSRS SYMCMWRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKD SAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGP GTLVTVSS
239	CD79b/5C7 (2+1B) Fc- optimizado L1 (CD79b)	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
240	CD79b/5C7 (2+2A) Fc- optimizado H	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKLEWIGIIIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
241	CD79b/5C7 (2+2A) Fc- optimizado L	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGECGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT ITCQASESVDRNNRLAWFQQKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGF CGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFSFSSSYMCMWRQAPGKLEWIGCLSVGD GHTYYASWAKGRFTISKDSKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCA RAPSYSGDGGHGYDLWGPGLTVTVSS
242	CD79b/5C7 (2+2B) Fc- optimizado H	EQQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTINIDYWISWVRQAP GKLEWIGIIIDPGDGTTFYFAIWVSGRFTISFDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYFCVREFSASAYQYDLWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASESVDRNNRLAWFQ QKPGKPPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGFGCGTKVEIKGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSRS YMCMWRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKDS AKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGP GLTVTVSS
243	CD79b/5C7 (2+2B) Fc- optimizado L	ELVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEDIENYLAWYQQKPGQ PPRLLIYRASTLSSGVPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFA VYYCQQGYRNSNVDNPFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

		QDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
244	CD79b/3A7 (2+2B) Fc- silenciado H	QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFSGMYWICWVRQAPG KGLEWIAICIYTGSSSTGYASWAKGRFTISKTSSTVTTLQMTS LTAADTATHFCASPYGDS SHYRGLNLWGPGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVDNRNRLA WQKPGKPKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGGGTKVEIKGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSRS SYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTISKD SAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLWGP GTLVTVSS
245	CD79b/3A7 (2+2B) Fc- silenciado L	AVVMTQTPASVEAAVGGTVTINCQASQRINNYLSWFQQKPGQ PKLLIYGAATLASGVPSRFGSGSGTEYTLTISDLEPADAA TYYCQCTYGIPSSNYGFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
246	CD79b/13E6 (2+2B) Fc- silenciado H	QSLEESGGDLVKPGGTLTLTCTASGFSFSSSYWLCWVRQAPG KGLEWIAICIYGGSSRGTYIASWAKGRFTISKTSSTVTTLQMT SLTAADTATYFCASHTYTYPRFSYFNLWGPGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASESVDNRNRLA WFQQKPGKPKPKLLIYTTSTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDVATYYCAGYRGAHTDGDAGGGTKVEIKGGGGSGGG SGGGGGSGGGGSEQQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFS RSSYMCWVRQAPGKLEWIGCLSVGDGHTYYASWAKGRFTIS KDSAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYFCARAPSYSGDGGHGYDLW GPGTLVTVSS
247	CD79b/13E6 (2+2B) Fc- silenciado L	AFEMTQTPASVSPAVGGTVSINCQASEDIESSLAWYQQKPGQ PKLLIYDASDLESGVPSRFGSGSGTEYTLTISGVQPADAA TYFCQSAYYTGSADNTFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC

Otras modalidades

Debe entenderse que la invención se ha descrito
junto con la descripción detallada de esta, la descripción
anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la
5 invención, que se define por el alcance de las

reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.