



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020007002-5 A2



(22) Data do Depósito: 09/10/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 17/11/2020

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-CD38 E MÉTODOS DE USO

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; C07K 16/00; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 03/08/2018 EP 18187186.4; 10/10/2017 US 62/570,655; 11/10/2017 US 62/570,660; 24/05/2018 US 62/676,221.

(71) Depositante(es): SANOFI.

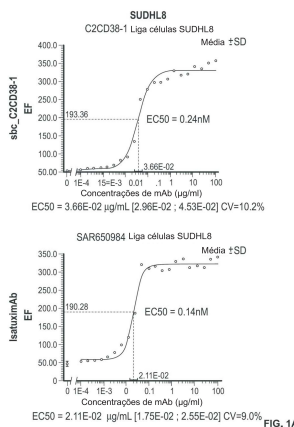
(72) Inventor(es): LAN WU; LING XU; EDWARD SEUNG; RONNIE WEI; GARY NABEL; ZHI-YONG YANG; TARIK DABDOUBI; BÉATRICE CAMERON; CENDRINE LEMOINE; CATHERINE PRADES.

(86) Pedido PCT: PCT US2018055084 de 09/10/2018

(87) Publicação PCT: WO WO/2019/074973 de 18/04/2019

(85) Data da Fase Nacional: 08/04/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se as proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38, por exemplo, polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo. Por exemplo, as proteínas de ligação podem ser proteínas de ligação monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas com pelo menos um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38. A descrição também provê métodos para produzir proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38 e usos de tais proteínas de ligação.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"ANTICORPOS ANTI-CD38 E MÉTODOS DE USO".

REFERÊNCIAS CRUZADAS A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório dos EUA N°. de Série 62/570.655, depositado em 10 de outubro de 2017; Pedido Provisório dos EUA N°. de Série 62/570,660, depositado em 11 de outubro de 2017; Pedido Provisório dos EUA N°. de Série 62/676,221, depositado em 24 de maior de 2018; e Pedido EP N°. EP18187186.4, depositado em 3 de agosto de 2018; todos os quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

SUBMISSÃO DE LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS EM ARQUIVO DE TEXTO ASCII

[002] O conteúdo da seguinte submissão em formato de arquivo ASCII é incorporado neste documento por referência em sua totalidade: uma forma legível por computador (CRF) da Listagem de Sequências (nome de arquivo: 183952029941seqlist.TXT, data de gravação: 8 de outubro de 2018, tamanho: 158 KB).

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A descrição presente invenção refere-se a proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38 (por exemplo, polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo), incluindo proteínas de ligação monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas com pelo menos um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, bem como polinucleotídeos, células hospedeiras, métodos de produção e métodos de uso relacionados aos mesmos.

ANTECEDENTES

[004] Produtos bioterapêuticos baseados em anticorpos monoclonais têm se tornado uma avenida importante para o desenvolvimento de novas drogas. A tecnologia de anticorpos monoclonais oferece direcionamento específico, entrega de sinalização

precisa e/ou carga útil para a população celular específica, e provê efeito biológico duradouro através de suas funções Fc. Os esforços na engenharia de anticorpos têm permitido o desenvolvimento de anticorpos multiespecíficos combinando as especificidades de múltiplos anticorpos monoclonais para várias aplicações biológicas, expandindo o escopo do desenvolvimento de drogas de anticorpos.

[005] CD38 é um alvo de drogas atraente, uma vez que é expresso na superfície celular de uma variedade de células tumorais linfoides (ver Stevenson, G.T. (2006) *Mol. Med.* 12:345-346). DARZALEX® (daratumumab) é um anticorpo anti-CD38 aprovado para uso no tratamento de mieloma múltiplo. No entanto, existe a necessidade de terapêutica de direcionamento de CD38 com um modo de ação diferente e/ou propriedades melhoradas, incluindo, mas sem limitação, ligação de alta afinidade a CD38, reatividade cruzada entre polipeptídeos CD38 humanos e de macaco de cinomolgo, ligação a células de linfoma (por exemplo, linhagens celulares de linfoma de células B grandes de mieloma múltiplo), e a capacidade de induzir apoptose e/ou citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e atividades antitumorais mediadas por células T.

BREVE SUMÁRIO

[006] São providas neste documento proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38 (por exemplo, polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo), incluindo proteínas de ligação monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas com pelo menos um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38. Vantajosamente, essas proteínas de ligação têm a capacidade de recrutar células T na proximidade de células de câncer, subsequentemente para ativar células T e promover a o extermínio de células T ativadas de células de câncer adjacentes através de um mecanismo de Granzima/Perforina, provendo um modo de ação

diferente para atividade antitumor de anticorpos anti-CD38, tais como DARZALEX® (daratumumab). Além disso, a capacidade de ligar ambos os polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo permite que proteínas de ligação sejam facilmente testadas em estudos toxicológicos pré-clínicos, por exemplo, para avaliar seus perfis de segurança para uso clínico posterior.

[007] Em algumas modalidades, são providas neste documento proteínas de ligação monoespecíficas que se ligam a um polipeptídeo CD38 humano. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação reagem de forma cruzada com polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação se ligam a polipeptídeos CD38 humanos de isoforma A e isoforma E. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação possuem uma ou mais das seguintes características (em qualquer combinação): liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada com uma K_D de 1,5 nM ou menos, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como

uma proteína purificada, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada com uma K_D de 3,5 nM ou menos, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 7,5 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) como uma proteína purificada, como análise por ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; induz apoptose ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de uma célula expressando CD38 em sua superfície celular; e tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em ligação reduzida a $Fc\gamma RI$ e/ou $Fc\gamma RII$, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações. Para ensaios exemplificativos, ver Exemplos 1, 3 e 4. Em algumas modalidades, a K_D é medida a 4°C ou 25°C.

[008] Em algumas modalidades, são providas neste documento proteínas de ligação triespecíficas que se ligam a um polipeptídeo CD38 humano. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas se ligam (por exemplo, simultaneamente) a um

polipeptídeo CD38 (por exemplo, expresso na superfície de uma célula) e um ou mais outros antígenos alvo expressos na superfície de uma segunda célula, recrutando assim a segunda célula em proximidade com a célula expressando o polipeptídeo CD38. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas se ligam (por exemplo, simultaneamente) a um polipeptídeo CD38 (por exemplo, expresso na superfície de uma célula) e um ou dois antígenos alvo expressos na superfície de uma célula T, recrutando assim a célula T em proximidade com a célula expressando o polipeptídeo CD38. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas ativam a célula T e/ou proveem um sinal coestimulatório mediado por CD28 à célula T. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas reagem de forma cruzada com polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas se ligam a polipeptídeos CD38 humanos de isoforma A e isoforma E. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas possuem uma ou mais das seguintes características (em qualquer combinação): liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada com uma KD de 1,5 nM ou menos, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula

com uma KD aparente de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada com uma KD de 3,5 nM ou menos, como análise por SPR; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 7,5 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) como uma proteína purificada, como análise por ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; induz apoptose ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de uma célula expressando CD38 em sua superfície celular; e tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em ligação reduzida a $Fc\gamma RI$ e/ou $Fc\gamma RII$, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações; induz proliferação de células T (por exemplo, célula T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$); induz expressão de células T (por exemplo, célula T $CD4^+$ e/ou $CD8^+$) de Bcl-xL; induz apoptose

de células CD38+; liga-se a CD38 expresso na superfície de uma célula e um ou mais antígeno(s) alvo de célula T expresso(s) na superfície de uma célula T; liga-se a CD38 expresso na superfície de uma célula, CD28 expresso na superfície de uma célula T, e CD3 expresso na superfície de uma célula T; estimula ativação do receptor de célula T; induz coestimulação de sinalização de receptor de célula T (por exemplo, como mediado por CD28); e tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em indução reduzida de liberação de citocina (por exemplo, IFN- γ , IL-2 e/ou TNF- α) por PBMCs, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações; induz liberação de citocina (por exemplo, IFN- γ e/ou IL-6) por PBMCs na presença de uma célula alvo CD38+. Para ensaios exemplificativos, ver Exemplos 1, 3 e 4. Em algumas modalidades, a K_D é medida a 4°C ou 25°C.

[009] Em algumas modalidades, é aqui provida uma proteína de ligação compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, em que o sítio de ligação a antígeno compreende: (a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e/ou (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ

ID NO: 36). Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno compreende: (a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e/ou (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno compreende: (a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e/ou (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-

H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 87), ou QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); em que FR2 compreende a sequência MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) ou MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); em que FR3 compreende a sequência NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 93) ou NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 94); e em que FR4 compreende a sequência WGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 96). Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o domínio VH

compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno compreende: (a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 87), ou QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); em que FR2 compreende a sequência MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) ou MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); em que FR3 compreende a sequência NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 93) ou NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 94); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLTVSS

(SEQ ID NO: 96). Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16.

[0010] Em algumas modalidades, é aqui provida uma proteína de ligação compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, em que o sítio de ligação a antígeno compreende: (a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); e (b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e/ou o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 12. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio

extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 2,1 nM ou menos. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 1,3 nM ou menos.

[0011] Em algumas modalidades de qualquer uma das modalidades acima, a proteína de ligação é um anticorpo quimérico ou humanizado. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo humano. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma ou mais cadeias pesadas de anticorpo de comprimento total compreendendo uma região Fc. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc humana compreendendo uma ou mais mutações que reduzem ou eliminam função efectora e/ou ligação a receptor Fc da região Fc. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG1 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A. Em algumas modalidades, a

região Fc de IgG1 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A e L235A. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-237 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que a sequência EFLGG é substituída por PVAG. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um fragmento F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv ou scFv de anticorpo. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é conjugada a um rótulo ou agente citotóxico. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é uma proteína de ligação biespecífica compreendendo o primeiro sítio de ligação a antígeno que liga o polipeptídeo CD38 e um segundo sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo o primeiro sítio de ligação a antígeno que liga o polipeptídeo CD38, um segundo sítio de ligação a antígeno, e um terceiro sítio de ligação a antígeno. Em

algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação a antígeno liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, e em que o segundo e terceiro sítios de ligação a antígeno ligam, cada um, uma proteína de superfície de célula T. Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação a antígeno liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, e em que (a) o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 humano, e o terceiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 humano, ou (b) o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 humano, e o terceiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 humano.

[0012] Em algumas modalidades, é aqui provida uma proteína de ligação compreendendo três sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma ou mais proteínas alvo, em que pelo menos um dos três sítios de ligação a antígeno reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, a proteína de ligação reage de maneira cruzada com um polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 105. Em algumas modalidades, a proteína de ligação reage de maneira cruzada com um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo e dois sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma proteína de superfície de célula T. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco

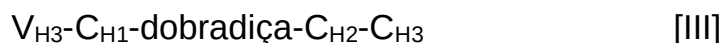
cinomolgo, um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD28 humano, e um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD3 humano. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

[0013] V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0014] V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0015] V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0016] V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0017] V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0018] V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0019] C_L é um domínio constante de cadeia leve de

imunoglobulina;

[0020] C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

[0021] C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

[0022] C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

[0023] dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

[0024] L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

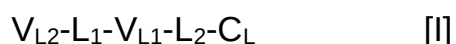
[0025] em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada, e

[0026] em que: (a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

[0027] (b) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3

compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou

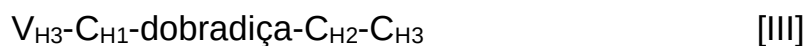
[0028] (c) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

[0029] V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0030] V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0031] V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0032] V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0033] V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0034] V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0035] C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

[0036] C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

[0037] C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

[0038] C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

[0039] dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

[0040] L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

[0041] em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada, e

[0042] em que: (a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

[0043] (b) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou

[0044] (c) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID

NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de

GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de

GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a

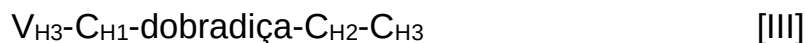
sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6; o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18; o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18; o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18; ou o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

[0045] V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0046] V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0047] V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de

imunoglobulina;

[0048] V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0049] V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0050] V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0051] C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

[0052] C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

[0053] C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

[0054] C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

[0055] dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

[0056] L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

[0057] em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada, e

[0058] em que (a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID

NO: 46);

[0059] (b) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46); ou

[0060] (c) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a

sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54; o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54; o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54; o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54 o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85; o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H1}

compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85; o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85; ou o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14; ou o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, pelo menos um de L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 tem independentemente 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 têm, cada um independentemente, pelo menos um aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, (a) L_1 , L_2 , L_3 e L_4 , cada um independentemente, têm zero aminoácido de comprimento ou compreendem uma sequência

selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59); ou (b) L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ compreende a sequência TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ compreende a sequência S, e L₄ compreende a sequência RT; L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ tem 0 aminoácido de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento; L₁ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ tem 0 aminoácido de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento; ou L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ tem 0 aminoácido de comprimento, L₃ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A e L235A. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em

posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S. Em algumas modalidades, o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V; e em que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da terceira cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W. Em algumas

modalidades, o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W; e em que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da terceira cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 67, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 68, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 70, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

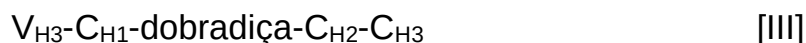
[0061] Em algumas modalidades, é aqui provida uma proteína de ligação compreendendo três sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma ou mais proteínas alvo, em que a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:

$V_{L3}-C_L$

[IV]

em que:

[0062] V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0063] V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0064] V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

[0065] V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0066] V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0067] V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

[0068] C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

[0069] C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

[0070] C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

[0071] C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

[0072] dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

[0073] L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

[0074] em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada; e

[0075] em que (a) os domínios dobradiça- $C_{H2}-C_{H3}$ da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- $C_{H2}-C_{H3}$ de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- $C_{H2}-C_{H3}$ compreendem,

cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S; ou (b) os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG4 humana compreendem substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-237 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que a sequência EFLGG é substituída por PVAG. Em algumas modalidades, pelo menos um par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38. Em algumas modalidades, um, dois ou três pares de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} formam um sítio de ligação a antígeno que liga um alvo de antígeno selecionado do grupo que consiste em A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8,

IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1. Em algumas modalidades, um primeiro par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD3 humano, um segundo par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD28 humano, e um terceiro par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um alvo de antígeno humano selecionado do grupo que consiste em A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG,IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1,

SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1.

[0076] Em algumas modalidades, é aqui provido um kit de polinucleotídeos, compreendendo: (a) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 74, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75; (b) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 77, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75; (c) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 79, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75; (d) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 80, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81; (e) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 82, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81; ou (f) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID

NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 83, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81.

[0077] Em algumas modalidades, é aqui provido um polinucleotídeo compreendendo a proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima. Em algumas modalidades, é aqui provido um vetor compreendendo um polinucleotídeo compreendendo a proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima.

[0078] Em algumas modalidades, é aqui provida uma célula hospedeira compreendendo o kit de polinucleotídeos, polinucleotídeo ou vetor de qualquer uma das modalidades acima. Em algumas modalidades, é aqui provido um método de produzir uma proteína de ligação, o método compreendendo cultivar a célula hospedeira de qualquer uma das modalidades acima, tal que a proteína de ligação seja produzida. Em algumas modalidades, o método ainda compreende recuperar a proteína de ligação da célula hospedeira.

[0079] Em algumas modalidades, é aqui provida uma composição farmacêutica compreendendo a proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima e um veículo farmacêuticamente aceitável.

[0080] Em algumas modalidades, é aqui provido um método de prevenir e/ou tratar câncer em um paciente compreendendo administrar ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima ou a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades acima. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo um primeiro sítio de ligação a antígeno que liga CD3, um segundo sítio de ligação a antígeno que liga CD28, e um terceiro sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano. Em algumas modalidades, a pelo

menos uma proteína de ligação é coadministrada com um agente quimioterápico. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, o câncer é leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), ou um linfoma de células B. Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano. Em algumas modalidades, o paciente é selecionado para tratamento porque as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano (por exemplo, como estabelecido na SEQ ID NO: 105) em sua superfície celular. Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e CD28. Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e não expressam CD28.

[0081] Em algumas modalidades, é aqui provida pelo menos uma proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima ou a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades acima para uso na prevenção e/ou tratamento de câncer em um paciente (por exemplo, um paciente em necessidade do mesmo, tal como um paciente com câncer). Em algumas modalidades, é aqui provida pelo menos uma proteína de ligação de qualquer uma das modalidades acima ou a composição farmacêutica de qualquer uma das modalidades acima para uso na fabricação de um medicamento para prevenir e/ou tratar câncer em um paciente (por exemplo, um paciente em necessidade do mesmo, tal como um paciente com câncer). Em algumas modalidades de qualquer uma das modalidades acima, a proteína de ligação é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo um primeiro sítio de ligação a antígeno que liga CD3, um segundo sítio de ligação a antígeno que liga CD28, e um terceiro sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano. Em algumas modalidades, a pelo menos uma proteína de ligação deve ser coadministrada com um agente quimioterápico. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo.

Em algumas modalidades, o câncer é leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), ou um linfoma de células B. Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano. Em algumas modalidades, o paciente é selecionado para tratamento porque as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano (por exemplo, como estabelecido na SEQ ID NO: 105) em sua superfície celular. Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e CD28. Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e não expressam CD28.

[0082] Deve-se compreender que uma, alguma ou todas as propriedades das várias modalidades descritas neste documento podem ser combinadas para formar outras modalidades da presente invenção. Esses e outros aspectos da invenção se tornarão evidentes para um versado na técnica. Essas e outras modalidades da invenção são ainda descritas pela descrição detalhada a seguir.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0083] O arquivo de patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias dessa patente ou publicação de pedido de patente com desenhos em cores serão fornecidas pelo Escritório mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0084] A Figura 1A mostra a ligação de anticorpos anti-CD38 mAb1 (superior) e isatuximab (inferior) a células de linfoma humano SU-DHL-8 ou células de mieloma múltiplo humano MOLP-8 usando citometria de fluxo.

[0085] A Figura 1B mostra os resultados de ensaios de ligação por citometria de fluxo examinando a ligação de anticorpos anti-CD38 mAb1 ou isatuximab (nenhuma ligação observada) a células expressando CD38 de macaco cinomolgo em sua superfície.

[0086] As Figuras 2A-2I mostram os resultados de ensaios caracterizando a ligação de anticorpos anti-CD38 a polipeptídeos CD38

humanos e de macaco cinomolgo. A Figura 2A mostra a ligação de anticorpo anti-CD38 humanizado mAb2 a CD38 humano solúvel (superior, "hCD38::Histag") ou CD38 de macaco cinomolgo (superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, bem como a ligação de mAb2 à superfície de células expressando CD83 humano (inferior, como indicado) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior, como indicado) por citometria de fluxo. A Figura 2B mostra a ligação de mAb2 a CD38 humano (superior) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior) por ressonância de plasmons de superfície (SPR). A Figura 2C mostra a ligação de anticorpo anti-CD38 humanizado mAb3 a CD38 humano solúvel (superior, "hCD38::Histag") ou CD38 de macaco cinomolgo (superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, bem como a ligação de mAb3 à superfície de células expressando CD83 humano (inferior, como indicado) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior, como indicado) por citometria de fluxo. A Figura 2D mostra a ligação de mAb3 a CD38 humano (superior) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior) por SPR. A Figura 2E mostra a ligação de anticorpo anti-CD38 humanizado mAb5 a CD38 humano solúvel (superior, "hCD38::Histag") ou CD38 de macaco cinomolgo (superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, bem como a ligação de mAb5 à superfície de células expressando CD83 humano (inferior, como indicado) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior, como indicado) por citometria de fluxo. A Figura 2F mostra a ligação de mAb5 a CD38 humano (superior) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior) por SPR. A Figura 2G mostra a ligação de humano anti-CD38 anticorpo hhy1370 a CD38 humano solúvel (superior, "hCD38::Histag") ou CD38 de macaco cinomolgo (superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, bem como a ligação de hhy1370 à superfície de células expressando CD83 humano (inferior, como indicado) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior, como indicado) por citometria de fluxo. A Figura 2H mostra a ligação de hhy1370 a CD38

humano (superior) ou CD38 de macaco cinomolgo (inferior) por SPR. A Figura 2I resume os dados de ligação dos experimentos ELISA, SPR e FACS, bem como a identidade percentual de cada domínio VH ("H") ou VL ("L") de anticorpo à sequência de região V humana de cima para baixo: corresponde a mAb2, mAb3, mAb 4, mAb 5, e mAb6 última linha (1195 HHKK-3 tem não foi descrito por sua sequência de aminoácido VL/VH no texto abaixo).

[0087] A Figura 2J mostra a indução dependente de concentração de apoptose de células SU-DHL-8 por mAb7 e mAb1 após incubação por 72 horas a 37°C.

[0088] A Figura 2K mostra atividade de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) de isatuximab e mAb1 contra células SU-DHL-8 na presença de células NK92.

[0089] A Figura 2L mostra atividade de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) dependente de concentração de isatuximab (direita) e mAb1 (esquerda) contra células SU-DHL-8 na presença de NK92 células após 4 horas a 37°C.

[0090] As Figuras 2M-2Q mostraram os resultados de ensaios de indução de apoptose usando os anticorpos anti-CD38 indicados contra células tumorais SU-DHL-8. Apoptose foi quantificada medindo dual absorção de iodeto de propídio e Anexina V através de citometria de fluxo. A Figura 2M mostra a porcentagem de células apoptóticas induzidas por cada anticorpo. As Figuras 2N-2Q mostram indução dependente de dose de apoptose em células de linfoma SU-DHL-8 por anticorpos anti-CD38 mAb2 (Figura 2N), mAb3 (Figura 2O), mAb4 (Figura 2P), e mAb5 (Figura 2Q), bem como o IC50 para cada anticorpo.

[0091] A Figura 3A provê uma representação esquemática de uma proteína de ligação triespecífica compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam três sítios de ligação a antígeno que liga três proteínas alvo: CD28, CD3, e CD38. Um primeiro par de polipeptídeos

possui dual domínios variáveis tendo uma orientação cruzada (VH1-VH2 e VL2-VL1) formando dois sítios de ligação a antígeno que reconhecem CD3 e CD28, e um segundo par de polipeptídeos possui a domínio variável único (VH3 e VL3) formando um único sítio de ligação a antígeno que reconhece CD38. A proteína de ligação triespecífica mostrada na Figura 3A usa uma região constante de IgG4 com uma mutação "*knobs-into-holes*", em que o *knob* está no segundo par de polipeptídeos com um domínio variável único.

[0092] A Figura 3B provê uma representação esquemática de um ensaio baseado em SPR para examinar a capacidade de cada domínio de ligação a antígeno de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3 de ligarem seu antígeno cognato.

[0093] A Figura 3C mostra os resultados de ensaios baseados em SPR para examinar ligação de CD38 a proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3. A ligação de CD38 humano a proteínas de ligação triespecíficas foi examinada individualmente (esquerda superior), após pré-ligação com CD3 (centro superior), após pré-ligação com CD28 (direita superior), após pré-ligação a CD3, em seguida, CD28 (esquerda inferior), ou após pré-ligação a CD28, em seguida, CD3 (direita inferior).

[0094] A Figura 4 mostra a ligação sequencial de CD3 humano, CD28, e polipeptídeos CD38 a proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3, como análise por SPR.

[0095] A Figura 5 resume as afinidades de ligação de proteínas de ligação triespecíficas indicadas contra seus antígenos cognatos (CD3, CD28 e CD38 humano) como medido por SPR.

[0096] A Figura 6A compara a afinidade aparente de domínio de ligação a antígeno isatuximab em formato de IgG1 humana (2ª folha) ou em um formato proteína de ligação triespecífica com os domínios de ligação a antígeno isatuximab, anti-CD28, e anti-CD3 (formato de

acordo com a Figura 3A; 1ª folha) para ligar polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior), como análise por citometria de fluxo.

[0097] As Figuras 6B-6D comparam as afinidades aparentes de proteína de ligação triespecífica $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$, $CD38_{VH1} \times CD28_{cvn} \times CD3_{mid}$, ou anticorpo anti-CD38 monoespecífico mAb2 para ligação a células expressando polipeptídeos CD38 humanos ou de macaco cinomolgos, como análise por citometria de fluxo. A Figura 6B mostra a ligação de proteína de ligação triespecífica $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ a células expressando polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior). A Figura 6C mostra a ligação de proteína de ligação triespecífica $CD38_{VH1} \times CD28_{cvn} \times CD3_{mid}$ a células expressando polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior). A Figura 6D mostra a ligação de anticorpo anti-CD38 monoespecífico mAb2 a células expressando polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior).

[0098] A Figura 6E compara as afinidades aparentes de proteína de ligação triespecífica $CD38_{HHY1370} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ ou anticorpo anti-CD38 monoespecífico mAb6 para ligação a células expressando polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior), como análise por citometria de fluxo.

[0099] A Figura 6F resume a afinidade de ligação das proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 indicadas para CD38 humano, como medido por SPR ou citometria de fluxo (FACS).

[00100] A Figura 6G mostra a afinidade aparente de proteína de ligação triespecífica $\Delta CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ sem o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 para ligação a células expressando polipeptídeos CD38 humanos (superior) ou de macaco cinomolgo (inferior), como análise por citometria de fluxo.

[00101] As Figuras 7A & 7B mostram os resultados de um ensaio ELISA determinando as afinidades de ligação de várias proteínas de ligação triespecíficas de IgG4 anti-CD38 x CD28 x CD3, ou anticorpos de controle, a polipeptídeos CD3, CD28 e CD38 humanos e de macaco rhesus.

[00102] As Figuras 8A-8D mostram os resultados de extermínio específico mediado por anticorpo de células CD38⁺ por PBMCs de três doadores humanos diferentes usando as proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38 x CD28 x CD3 indicadas e anticorpos de controle. Resultados representativos usando linhagens celulares de mieloma múltiplo RPMI8266 (Figura 8A), NCI-H929 (Figura 8B), KMS-26 (Figura 8C), e linhagens celulares KMS-11 (Figura 8D) são mostrados, e valores EC50 são providos na Tabela N. Valores EC50 obtidos usando células NCI-H929, KMS-26 e KMS-11 são providas nas Tabelas O-Q.

[00103] As Figuras 8E & 8F mostram os resultados de extermínio específico mediado por anticorpo de células CD38⁺ por PBMCs de dois doadores diferentes usando as proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38 x CD28 x CD3 indicadas com regiões Fc variantes e anticorpos de controle. Resultados representativos usando linhagens celulares KMS-11 (Figura 8D) e U266 (Figura 8E) de CD38⁺ são mostrados, e valores EC50 são providos nas Tabelas Q2 e Q3.

[00104] As Figuras 9A, 9B & 10 mostram a ativação (CD69⁺) de células T humanas tratadas com várias proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38 x CD28 x CD3 ou anticorpos de controle por 24 horas. A Figura 9A mostra a ativação (CD69⁺) de células T CD3⁺ humanas. A Figura 9B mostra a ativação (CD69⁺) de células T CD3⁺ CD4⁺ humanas. A Figura 10 mostra a ativação (CD69⁺) de células T CD3⁺ CD8⁺ humanas.

[00105] As Figuras 11A-11B mostram os resultados de análises de

liberação de citocina *in vitro* de PBMCs humanas tratadas com as proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38 x CD28 x CD3 indicadas ou anticorpos de controle com base em método de placas secas como descrito em Stebbings, R. *et al.* (2007) *J. Immunol.* 179:3325-3331. A Figura 11A mostra os resultados usando 5µg/ml dos anticorpos indicados. A Figura 11B mostra os resultados usando 25ng/ml dos anticorpos indicados.

[00106] As Figuras 12A-12E mostram a atividade *in vivo* da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) no modelo de camundongo NSG humanizado com células sanguíneas do cordão umbilical CD34+ implantado com células de mieloma múltiplo RPMI-8226. A Figura 12A mostra a alteração de volume tumoral em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 12B mostra o volume tumoral médio no dia 18 em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 12C mostra o peso de tumor terminal médio em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 12D mostra a curva de crescimento tumoral média pela duração do experimento em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 12E mostra a alteração média de peso corporal em vários pontos no tempo pela duração do experimento de camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação

triespecífica anti- CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38.

[00107] As Figuras 13A-13F mostram a atividade *in vivo* da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) no modelo de camundongo NSG humanizado com PBMCs implantado com células de mieloma múltiplo RPMI-8226. A Figura 13A mostra a alteração de volume tumoral em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 13B mostra o volume tumoral no dia 4 em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 13C mostra o volume tumoral no dia 21 em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 13D mostra o volume tumoral médio no dia 21 em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 13E mostra o peso de tumor terminal médio em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38. A Figura 13F mostra o volume tumoral médio em vários pontos no tempo pela duração do experimento em camundongos tratados com as concentrações indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) vs. camundongos tratados com um anticorpo biespecífico anti-CD3/CD38.

[00108] As Figuras 14A-14U mostram os resultados de um estudo de

escalonamento de dose (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) usando as proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid), anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid), anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid), e anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid) em primatas não humanos. A Figura 14A mostra a ativação de células T (CD69⁺) de células T CD3⁺ em circulação após a administração de diferentes doses da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14B mostra a ativação de células T (CD69⁺) de células T CD3⁺ em circulação após a administração de diferentes doses da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14C mostra a ativação de células T (CD69⁺) de células T CD3⁺ em circulação após a administração de diferentes doses da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14D mostra a ativação de células T (CD69⁺) de células T CD3⁺ em circulação após a administração de diferentes doses da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14E mostra as alterações na porcentagem de células T CD4⁺ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14F mostra as alterações na porcentagem de células T CD8⁺ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14G mostra as alterações na porcentagem de células T CD4⁺ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14H mostra as alterações na porcentagem de células T CD8⁺ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14I mostra as alterações na porcentagem de células T CD4⁺ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-

CD38_(hhy1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14J mostra as alterações na porcentagem de células T CD8+ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid). A Figura 14K mostra as alterações na porcentagem de células T CD4+ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14L mostra as alterações na porcentagem de células T CD8+ em circulação após a administração das doses indicadas da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid). A Figura 14M mostra as alterações no total de células T CD4+ 6, 24 e 48 horas após a administração de 12,5 µg/kg das proteínas de ligação triespecíficas indicadas. A Figura 14N mostra as alterações no total de NK células 6, 24 e 48 horas após a administração de 12,5 µg/kg das proteínas de ligação triespecíficas indicadas. A Figura 14O mostra as alterações no total de células T CD8+ 6, 24 e 48 horas após a administração de 12,5 µg/kg das proteínas de ligação triespecíficas indicadas. A Figura 14P mostra as alterações no total de células B 6, 24 e 48 horas após a administração de 12,5 µg/kg das proteínas de ligação triespecíficas indicadas. A Figura 14Q mostra as alterações nos níveis de citocina 6 horas após a administração das três doses crescentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(sup) x CD3_(mid) (resultados de diferentes animais de teste rotulados como "117065" e "117066"). A Figura 14R mostra as alterações nos níveis de citocina 6 horas após a administração das três doses crescentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(VH1) x CD28_(cvn) x CD3_(mid) (resultados de diferentes animais de teste rotulados como "117067" e "117068"). A Figura 14S mostra as alterações nos níveis de citocina 6 horas após a administração das três doses crescentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(sup)

x CD3_(mid) (resultados de diferentes animais de teste rotulados como "117069" e "117070"). A Figura 14T mostra as alterações nos níveis de citocina 6 horas após a administração das três doses crescentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) da proteína de ligação triespecífica anti-CD38_(hhy1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid) (resultados de diferentes animais de teste rotulados como "117071" e "117072"). A Figura 14U mostra as alterações nos níveis de citocina 24 horas após a administração das três doses crescentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) das proteínas de ligação triespecíficas indicadas (resultados mostrados de todos os animais de teste).

[00109] As Figuras 14V & 14W mostram que proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid) e anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid) induziram a depleção de células T *in vivo* em sangue de primata não humano em doses mais altas (6 horas pós-dose).

[00110] As Figuras 14X & 14Y mostram que proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38_(HHY1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid) e anti-CD38_(HHY1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid) induziram a depleção de células T *in vivo* em sangue de primata não humano em doses mais altas (6 horas pós-dose).

[00111] As Figuras 14Z & 14AA mostram a quantidade de células T sanguíneas em primatas não humanos ao longo do tempo após a administração de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38_(VHI) x CD28_(sup) x CD3_(mid) ou anti-CD38_(VHI) x CD28_(cvn) x CD3_(mid).

[00112] As Figuras 14AB & 14AC mostram a quantidade de células T sanguíneas em primatas não humanos ao longo do tempo após a administração de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38_(HHY1370) x CD28_(sup) x CD3_(mid) ou anti-CD38_(HHY1370) x CD28_(cvn) x CD3_(mid).

[00113] As Figuras 14AD & 14AE mostram a quantidade de células T CD4⁺ com proteína de ligação triespecífica ligada após a administração de dose de 100µg/kg em primatas não humanos.

[00114] As Figuras 14AF & 14AG mostram a quantidade de células

T CD8+ com proteína de ligação triespecífica ligada após a administração de dose de 100µg/kg em primatas não humanos.

[00115] As Figuras 15A-15C mostram ligação ou falta desta de diversas variantes Fc a receptores Fc humanos FcγR I (Figura 15A), FcγR IIa (Figura 15B), e FcγR IIIb/c (Figura 15C). As variantes testadas foram IgG1 humana, IgG4 humana e IgG4 humana com mutações FALA.

[00116] A Figura 16 mostra a ligação de IgG4 humana, com ou sem mutações FALA, a FcRn.

[00117] A Figura 17 resume parâmetros PK das proteínas de ligação triespecíficas indicadas (CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} IgG4, CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} IgG4 FALA, CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} IgG1 LALA P329A, e CD38_{HHY1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid} IgG4 FALA) em camundongos NSG.

[00118] As Figuras 18A-18C mostram liberação mediada por interação Fc/FcR (não específica) de IFN-γ (Figura 18A), IL-2 (Figura 18B) ou TNF-α (Figura 18C) por PBMCs humanas incubadas com proteínas de ligação triespecíficas tendo regiões Fc variantes FALA ou de tipo selvagem.

[00119] A Figura 18D mostra ativação *in vitro* de PBMCs humanas por proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} e CD38_{HHY1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid}, bem como Variantes Fc de IgG1 e IgG4 das mesmas.

[00120] As Figuras 19A&19B mostram que a indução de Bcl-xL em células T CD4+ (Figura 19A) ou CD8+ (Figura 19B) pela proteína de ligação triespecífica CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} requer ambos domínios de ligação a antígeno CD3 e CD28. Gráfico de barras=média e s.d. de 3 doadores de PBMC. *p=≤0,009.

[00121] As Figuras 19C&19D mostram que CD38_{VH1}×CD28×CD3 com variante Fc FALA de IgG4 sobrerregula Bcl-xL em células T CD4+

(Figura 19C) ou CD8⁺ (Figura 19D) mais do que um anticorpo biespecífico de referência. Gráfico de barras=média e s.d. de 3 doadores de PBMC. *p=≤0,045

[00122] A Figura 19E mostra que a ativação de células T por proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3, como análise por expressão de IL-2 em uma linhagem repórter de células T Jukart, é dependente do domínio de ligação a antígeno anti-CD3.

[00123] A Figura 19F mostra a liberação de citocinas TNF, IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-10 por proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, em comparação com proteínas de ligação com anti-CD28, anti-CD38, ou anti-CD28, anti-CD38 e anti-CD3 mutados, bem como a referência.

[00124] A Figura 19G mostra a proliferação de células T ativadas por proteína de ligação triespecífica anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 com variante Fc FALA de IgG4, anticorpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referência, ou controle de isótipo (proteína de ligação triespecífica com variante Fc FALA de IgG4 tendo domínios de ligação mutados).

[00125] A Figura 20 mostra a proliferação de células T ativadas por proteína de ligação triespecífica anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 com variante Fc FALA de IgG4, proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 com variante Fc FALA de IgG4 e uma mutação no domínio de ligação a antígeno CD38, CD28 ou CD3, ou controle de isótipo (proteína de ligação triespecífica com variante Fc FALA de IgG4 tendo três domínios de ligação mutados).

[00126] A Figura 21 mostra atividade antitumoral *in vivo* de proteína de ligação triespecífica FALA de IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} administrada nas doses indicadas em um modelo de tumor disseminado NCI-H929-Luc em camundongos NSG humanizados com PBMC.

[00127] A Figura 22 mostra atividade antitumoral *in vivo* de proteína

de ligação triespecífica FALA de IgG4 CD38_{HHY1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid} administrada nas doses indicadas em um modelo de tumor disseminado NCI-H929-Luc em camundongos NSG humanizados com PBMC.

[00128] As Figuras 23A & 23B mostram potente atividade de extermínio de tumor *in vitro* de células NCI-929-Luc com proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} e CD38_{HHY1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, e anticorpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referência usando as PBMCs humanas usadas no estudo *in vivo*. PBMCs humanas de dois camundongos NSG humanizados doadores foram usadas após 24h. Incubação com uma proporção efetora:PBMC de 10:1.

[00129] A Figura 23C mostra superior atividade antitumoral *in vivo* de proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} e CD38_{hhy1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, em comparação com anticorpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referência, administradas nas doses indicadas em um modelo de tumor disseminado NCI-H929-Luc em camundongos NSG humanizados com PBMC. As proteínas de ligação foram administradas por injeção intraperitoneal (IP) semanalmente a 30µg/kg.

[00130] A Figura 24A mostra os resultados de um ensaio repórter de luciferase usando células Jukart GloResponse™ IL2-luc2P (Promega) após estimulação por CD38_{VH1}/CD28_{sup}XCD3_{mid} e seus mutantes KO triplos e KO de sítio de ligação únicos em concentração de 10 nM.

[00131] A Figura 24B mostra a otimização de anticorpo anti-CD3xCD28 CODV-Fab. A configuração ideal de α-CD3 e α-CD28 em posições alternativas do Fab biespecífico de CODV foi avaliada por ensaios de liberação de citocina usando PBMCs humanas *in vitro*. CD28 distal x CD3 proximal foi identificado como posicionamento ideal com base na secreção de IFN-γ e IL-2 em sobrenadante após 24 horas.

[00132] A Figura 25 mostra que sobreexpressão induzida por

CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid} de membro Bcl-xL da família Bcl-2 em células T primárias é dependente de CD28.

[00133] A Figura 26 mostra que anti-CD28 no Ab triespecífico forneceu sinalização secundária essencial para suportar proliferação de células T primárias *in vitro*.

[00134] A Figura 27 mostra a configuração do anticorpo triespecífico, codificado por cor por anticorpo de origem (esquerda). Sombras escuras (roxas ou verdes) representam peptídeos de cadeia pesada; sombras claras representam peptídeos de cadeia leve. É também mostrado um modelo de estrutura do Ab triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid} com base em estruturas de cristal de Fab VH1 anti-CD38 e Fab CODV CD28_{sup}/CD3_{mid} (direita).

[00135] As Figuras 28A & 28B mostram que células de mieloma múltiplo (MM) com alta (RPMI-8226; Figura 28A) e baixa (KMS-11; Figura 28B) expressão de superfície de CD38 foram lisadas de forma eficiente por PBMCs humanas (E:T=10:1) incubadas com várias concentrações do Ab triespecífico. Contribuição para a atividade de extermínio por cada sítio de ligação foi demonstrada por mutações KO de sítio de ligação, como indicado.

[00136] As Figuras 29A-29C mostram que o mutante KO anti-CD28_{sup} do Ab triespecífico apresentou atividade antitumoral marcadamente reduzida contra células MM CD38_{high}, CD38_{mid} e CD38_{low} *in vitro*. São mostrados ensaios usando células RPMI-8226 (Figura 29A), U266 (Figura 29B) ou KMS-11 (Figura 29C).

[00137] A Figura 30 mostra que redução de carga tumoral em grupos de tratamento com anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}_FALA foi dependente de dose e estatisticamente diferente em um modelo de linhagem celular de mieloma múltiplo humano disseminado usando um camundongo NSG reconstituído com células T primárias humanas amplificadas *in vitro*.

[00138] As Figuras 31A & 31B mostram análise por microscopia vital de citólise de células de mieloma pelo Ab triespecífico CD38 *in vitro* na presença de células T humanas primárias. A fotografia de tempo transcorrido de imagens microscópicas foi realizada usando um controle negativo (KO triplo triespecífico; Figura 31A) ou o Ab triespecífico CD38/CD28xCD3 (Figura 31B) usando PBMCs humanas incubadas com linhagem celular de mieloma RPMI-8226 rotulada com corante vermelho intenso CellTracker™. As imagens apresentadas foram coletadas após incubação de 24 horas. Barra de escala: 50µm.

[00139] A Figura 32 mostra mutações alternativas na região Fc de IgG4 preparada para análise em ensaios de ligação ao receptor Fc. São mostradas as SEQ ID NOs: 111-116 (de cima para baixo, respectivamente).

[00140] A Figura 33 mostra os resultados dos ensaios de SPR para medir a afinidade das variantes Fc de IgG4 especificadas para os receptores Fc humanos indicados.

[00141] A Figura 34 mostra que uma proteína de ligação triespecífica CD38 com ligação mínima de FcR reduziu liberação de citocina não específica por PBMCs humanas *in vitro*. Diferentes mutações de inativação de FcR (como indicado) foram analisadas quanto aos seus efeitos pró-inflamatórios no isótipo de IgG4 humano. As PBMCs humanas foram incubadas em meios (não estimulados) ou na presença das células de mieloma, RPMI-8226 (estimuladas), e as barras indicam os níveis de IFN-γ de sobrenadante medidos por ELISA.

[00142] A Figura 35 mostra que uma proteína de ligação triespecifica CD38 com ligação de FcR mínima lisou células de mieloma múltiplo humano com diferentes níveis de expressão de CD38. A citólise de células de mieloma com IgG4 ou as mutações Fc indicadas foi avaliada *in vitro* usando PBMCs humanas com os alvos tumorais indicados.

[00143] A Figura 36 mostra uma comparação da atividade citolítica

in vitro do Ab anti-CD38/CD28/CD3 triespecífico e o anticorpo anti-CD38 daratumumab medido usando PBMC humana como células efetoras contra as linhagens celulares RPMI-8226, U266 e KMS -11 (E:T=10:1).

[00144] As Figuras 37A-37D mostram a caracterização da expansão do subconjunto de células T *in vitro* em resposta a CD38/CD3xCD28. A avaliação da expansão do subconjunto de células T foi realizada revestindo cavidades com 350 ng/cavidade do Ab triespecífico CD38 na ausência de citocinas exógenas. As populações de células T foram medidas nos pontos no tempo indicados. O Ab triespecífico triplo mutante foi usado como controle negativo. Citometria de fluxo foi usada para determinar células T CD4 de memória efetoras e centrais (Figura 37A), células T auxiliares (Figura 37B), células T CD8 de memória efetoras e centrais (Figura 37C) e células CD8 pp65 específicas de CMV (Figura 37D) como descrito no Exemplo 12. A análise de células efetoras pp65 específicas de CMV foi realizada por coloração em pentâmero de PBMCs de doadores de HLA-A2 CMV+ tratados com triespecífico CD38 ou o controle negativo triplo.

[00145] A Figura 38 mostra a contribuição da expressão de CD28 em células alvo para suscetibilidade à citólise por CD38/CD3xCD28. CD28 foi eliminado em células KMS-11 usando direcionamento de gene CRISPR/Cas 9 e usado como alvos citolíticos *in vitro*. Em comparação com KMS-11 de origem, a expressão de CD38 foi preservada enquanto CD28 foi eliminado, como demonstrado por citometria de fluxo (painel superior, KMS-11 vs. KMS-11 (CD28KO)). Citólise da célula KO de CD28 foi examinada com o triespecífico nulo de CD28 ou WT (painel inferior; triespecífico vs. triespecífica (CD28KO)).

[00146] A Figura 39 mostra a atividade citolítica do Ab mutante FALA triespecífico CD38/CD28xCD3 contra as linhagens CD38⁺CD28⁻ indicadas, incluindo leucemia mielocítica aguda (AML (KG-1)), um linfoma de células B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL

(KOPN8)) e linfoma linfocítico crônico (CLL(Z-138)).

[00147] A Figura 40 mostra que ativação *in vitro* de PBMC humana por superagonista α -CD28 requer bivalência do anticorpo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00148] A descrição provê proteína de ligação compreendendo pelo menos um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38.

I. Definições Gerais

[00149] Como usado de acordo com a presente invenção, os termos a seguir, salvo indicado de outra forma, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados. Salvo disposição em contrário pelo contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e os termos plurais devem incluir o singular. Como usado nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um/a", e "o/a" incluem referentes plurais, a menos que o conteúdo indique claramente o contrário. Dessa forma, por exemplo, referência a "uma molécula" opcionalmente inclui uma combinação de duas ou mais dessas moléculas, e semelhantes.

[00150] Entende-se que aspectos e modalidades da presente invenção descritos neste documento incluem "compreendendo", "consistindo" e "consistindo essencialmente em" aspectos e modalidades.

[00151] O termo "polinucleotídeo", como usado neste documento, refere-se a polímeros de ácido nucleico de filamento simples ou filamento duplo com pelo menos 10 nucleotídeos de comprimento. Em determinadas modalidades, os nucleotídeos compreendendo o polinucleotídeo podem ser ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. Tais modificações incluem modificações básicas, tais como bromuridina, modificações de ribose, tais como arabinosídeo e 2', 3'-didesoxirribose, e modificações nas ligações internucleotídicas, tais como fosforotioato,

fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodisselenoato, fosfororoanilotioato, fosforaniladato e fosforanilamidato. O termo "polinucleotídeo" especificamente inclui as formas de DNA de filamento simples e filamento duplo.

[00152] Um "polinucleotídeo isolado" é um polinucleotídeo de origem genômica, de cDNA ou sintética, ou alguma combinação dos mesmos, que: (1) não está associado a todo ou uma porção de um polinucleotídeo no qual o polinucleotídeo isolado é encontrado na natureza, (2) é ligado a um polinucleotídeo ao qual não está ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

[00153] Um "polipeptídeo isolado" é aquele que: (1) é livre de pelo menos alguns outros polipeptídeos com os quais normalmente seria encontrado; (2) é essencialmente livre de outros polipeptídeos da mesma fonte, por exemplo, da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de espécie diferente, (4) foi separado de menos cerca de 50% de polinucleotídeos, lipídios, carboidratos ou outros materiais com os quais está associado na natureza, (5) não é associado (por interação covalente ou não covalente) com porções de um polipeptídeo com o qual o "polipeptídeo isolado" está associado na natureza, (6) é operativamente associado (por interação covalente ou não covalente) com um polipeptídeo com o qual não está associado na natureza, ou (7) não ocorre na natureza. Esse polipeptídeo isolado pode ser codificado por DNA, cDNA, mRNA ou outro RNA genômico, de origem sintética, ou qualquer combinação dos mesmos. De preferência, o polipeptídeo isolado é substancialmente livre de polipeptídeos ou outros contaminantes que são encontrados em seu ambiente natural que interfeririam com seu uso (terapêutico, diagnóstico, profilático, pesquisa ou outro).

[00154] Anticorpos de ocorrência natural geralmente compreendem um tetrâmero. Cada um desses tetrâmeros é tipicamente composto por

dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" de comprimento total (normalmente tendo um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" de comprimento total (normalmente tendo um peso molecular de cerca de 50-70 kDa). Os termos "cadeia pesada" e "cadeia leve", como usados neste documento, referem-se a qualquer polipeptídeo de imunoglobulina tendo sequência de domínio variável suficiente para conferir especificidade para um antígeno alvo. A porção amino-terminal de cada cadeia leve e pesada normalmente inclui um domínio variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos que normalmente é responsável pelo reconhecimento de antígenos. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define tipicamente um domínio constante responsável pela função efetora. Dessa forma, em um anticorpo de ocorrência natural, um polipeptídeo de imunoglobulina de cadeia pesada de comprimento total inclui um domínio variável (V_H) e três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}), em que o domínio V_H está no terminal amino do polipeptídeo e o domínio C_{H3} está no terminal carboxila, e um polipeptídeo de imunoglobulina de cadeia leve de comprimento total inclui um domínio variável (V_L) e um domínio constante (C_L), em que o domínio V_L está no terminal amino do polipeptídeo e o domínio C_L está no terminal carboxil.

[00155] As cadeias leves humanas são tipicamente classificadas como cadeia leves kapa e lambda, e as cadeias pesadas humanas são tipicamente classificadas como mu, delta, gama, alfa ou epsilon, e definem o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. A IgG possui várias subclasses, incluindo, mas sem limitação, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgM tem subclasses incluindo, mas sem limitação, IgM1 e IgM2. IgA é similarmente subdividida em subclasses incluindo, mas sem limitação, IgA1 e IgA2. Dentro de cadeias leves e pesadas de comprimento total, os domínios variáveis e constantes geralmente são unidos por uma região "J" de cerca de 12 ou

mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de 10 aminoácidos. Ver, por exemplo, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., Raven Press, 2ª ed., 1989), que é incorporado por referência na sua totalidade para todos os fins. As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/pesada geralmente formam um sítio de ligação a antígeno. Os domínios variáveis de anticorpos de ocorrência natural exibem tipicamente a mesma estrutura geral de regiões de quadro relativamente conservadas (FR) unidas por três regiões hipervariáveis, também denominadas regiões de determinação de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são tipicamente alinhadas pelas regiões de quadro, o que pode permitir a ligação a um epítopo específico. Do terminal amino ao terminal carboxila, ambos os domínios variáveis de cadeia leve e pesada tipicamente compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4.

[00156] O termo "conjunto de CDR" refere-se a um grupo de três CDRs que ocorrem em uma única região variável capaz de ligar o antígeno. Os limites exatos dessas CDRs foram definidos diferentemente de acordo com diferentes sistemas. O sistema descrito por Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1987) e (1991)) não apenas provou um sistema de numeração de resíduos inequívoco aplicável a qualquer região variável de um anticorpo, mas também provê limites precisos de resíduos que definem as três CDRs. Essas CDRs podem ser referidas como CDRs de Kabat. Chothia e colaboradores (Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-17; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 877-83) descobriram que certas subporções nas CDRs de Kabat adotam conformações de esqueleto peptídico quase idênticas, apesar de terem grande diversidade no nível de sequência de aminoácido. Essas subporções foram designadas como L1, L2 e L3 ou

H1, H2 e H3, em que "L" e "H" designam as regiões de cadeia leve e de cadeia pesada, respectivamente. Essas regiões podem ser referidas como CDRs de Chothia, que têm limites que se sobrepõem às CDRs de Kabat. Outros limites que definem CDRs que se sobrepõem às CDRs de Kabat foram descritos por Padlan, 1995, *FASEB J.* 9:133-39; MacCallum, 1996, *J. Mol. Biol.* 262 (5):732-45; e Lefranc, 2003, *Dev. Comp. Immunol.* 27:55-77. Ainda outras definições de limites de CDR podem não seguir estritamente um dos sistemas deste documento, mas, no entanto, se sobrepõem às CDRs de Kabat, embora elas possam ser encurtadas ou prolongadas em função de previsões ou descobertas experimentais de que resíduos específicos ou grupos de resíduos ou mesmo CDRs inteiras não afetam significativamente a ligação a antígeno. Os métodos usados neste documento podem usar CDRs definidas de acordo com qualquer um desses sistemas, embora certas modalidades usem CDRs definidas por Kabat ou Chothia. A identificação de CDRs previstas usando a sequência de aminoácidos é bem conhecida no campo, tal como em Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", *In Antibody Engineering*, vol. 2. Kontermann R., Dubel S., eds. Springer-Verlag, Berlim, p. 33-51 (2010). A sequência de aminoácido do domínio variável de cadeia leve e/ou pesada também pode ser inspecionada para identificar as sequências das CDRs por outros métodos convencionais, por exemplo, por comparação com sequências de aminoácido conhecidas de outras regiões variáveis de cadeia pesada e leve para determinar as regiões de hipervariabilidade de sequência. As sequências numeradas podem ser alinhadas no olho, ou usando um programa de alinhamento, tal como uma suíte CLUSTAL de programas, como descrito em Thompson, 1994, *Nucleic Acid Res.* 22:4673-80. Modelos moleculares são convencionalmente usados para delinear corretamente regiões de quadro e CDR e, dessa forma, corrigir as

atribuições baseadas em sequência.

[00157] Em algumas modalidades, a definição de CDR/FR em uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina deve ser determinada com base na definição de IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

[00158] O termo "Fc", como usado neste documento, refere-se a uma molécula que compreende a sequência de um fragmento de não ligação a antígeno resultante da digestão de um anticorpo ou produzido por outros meios, seja na forma monomérica ou multimérica, e pode conter a região de dobradiça. A fonte original de imunoglobulina da Fc nativa é preferencialmente de origem humana e pode ser qualquer uma das imunoglobulinas. As moléculas de Fc são constituídas por polipeptídeos monoméricos que podem ser ligados em formas diméricas ou multiméricas por associação covalente (isto é, ligações dissulfeto) e não covalentes. O número de ligações dissulfeto intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas Fc nativas varia de 1 a 4 dependendo da classe (por exemplo, IgG, IgA e IgE) ou subclasse (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2 e IgG4). Um exemplo de Fc é um dímero ligado a dissulfeto resultante da digestão de papaína de uma IgG. O termo "Fc nativo", como usado neste documento, é genérico para as formas monomérica, dimérica e multimérica.

[00159] Um fragmento F(ab) normalmente inclui uma cadeia leve e os domínios V_H e C_{H1} de uma cadeia pesada, em que a porção de cadeia pesada V_H-C_{H1} do fragmento F(ab) não pode formar uma ligação dissulfeto com outro polipeptídeo de cadeia pesada. Como usado neste documento, um fragmento F(ab) também pode incluir uma cadeia leve contendo dois domínios variáveis separados por um ligante de aminoácido e uma cadeia pesada contendo dois domínios variáveis separados por um ligante de aminoácido e um domínio C_{H1}.

[00160] Um fragmento F(ab') geralmente inclui uma cadeia leve e

uma porção de uma cadeia pesada que contém mais da região constante (entre os domínios C_{H1} e C_{H2}), tal que uma ligação dissulfeto intercadeia possa ser formada entre duas cadeias pesadas para formar uma molécula de $F(ab')_2$.

[00161] O termo "proteína de ligação", como usado neste documento, refere-se a uma molécula de ocorrência não natural (ou recombinante ou modificada) que especificamente se liga a pelo menos um antígeno alvo, por exemplo, um polipeptídeo CD38 da presente invenção.

[00162] Uma molécula "recombinante" é uma que foi preparada, expressa, criada ou isolada por meios recombinantes.

[00163] Uma modalidade da descrição provê proteínas de ligação com especificidade biológica e imunológica para entre um e três antígenos alvo. Outra modalidade da descrição provê moléculas de ácido nucleico que compreendem sequências de nucleotídeo que codificam cadeias de polipeptídeo que formam essas proteínas de ligação. Outra modalidade da descrição provê vetores de expressão compreendendo moléculas de ácido nucleico compreendendo sequências de nucleotídeo que codificam cadeias de polipeptídeo que formam essas proteínas de ligação. Ainda outra modalidade da descrição provê células hospedeiras que expressam essas proteínas de ligação (isto é, compreendendo moléculas de ácido nucleico ou vetores codificando cadeias de polipeptídeo que formam essas proteínas de ligação).

[00164] O termo "trocabilidade", como usado neste documento, refere-se à permutabilidade de domínios variáveis dentro de formato de proteína de ligação e com retenção de dobras e afinidade final de ligação. "Permutabilidade total" refere-se à capacidade de trocar a ordem de ambos os domínios V_{H1} e V_{H2} e, portanto, a ordem dos domínios V_{L1} e V_{L2} , na cadeia de polipeptídeo de fórmula I ou na cadeia

de polipeptídeo de fórmula II (ou seja, para inverter a ordem), mantendo a funcionalidade completa da proteína de ligação, como evidenciado pela retenção de afinidade de ligação. Além disso, deve-se notar que as designações V_H e V_L se referem apenas à localização do domínio em uma determinada cadeia de proteína no formato final. Por exemplo, V_{H1} e V_{H2} podem ser derivados de domínios V_{L1} e V_{L2} em anticorpos de origem e colocados nas posições de V_{H1} e V_{H2} na proteína de ligação. Da mesma forma, V_{L1} e V_{L2} podem ser derivados de domínios V_{H1} e V_{H2} em anticorpos de origem e colocados nas posições de V_{H1} e V_{H2} na proteína de ligação. Dessa forma, as designações de V_H e V_L referem-se à localização atual e não, à localização original em um anticorpo de origem. Os domínios V_H e V_L são, portanto, "permutáveis".

[00165] O termo "antígeno" ou "antígeno alvo" ou "alvo de antígeno", como usado neste documento, refere-se a uma molécula ou a uma porção de uma molécula que é capaz de ser ligada por uma proteína de ligação e, adicionalmente, é capaz de ser usada em um animal para produzir anticorpos capazes de ligação a um epítopo daquele antígeno. Um antígeno alvo pode ter um ou mais epítopos. Com relação a cada antígeno alvo reconhecido por uma proteína de ligação, a proteína de ligação é capaz de competir com um anticorpo intacto que reconhece o antígeno alvo.

[00166] "CD38" é agrupamento de 38 polipeptídeos de diferenciação e é uma glicoproteína encontrada na superfície de muitas células imunes. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga o domínio extracelular de um ou mais polipeptídeos CD38. Sequências de polipeptídeo de domínio extracelular de CD38 exemplificativos incluem, mas sem limitação, o domínio extracelular de CD38 humano (por exemplo, como representado por SEQ ID NO: 1) e o domínio extracelular de CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, como representado por SEQ ID NO: 30).

[00167] O termo "acoplador de célula T" refere-se a proteínas de ligação direcionadas a um sistema imune do hospedeiro, mais especificamente a atividade citotóxica das células T, bem como direcionadas a uma proteína alvo de tumor.

[00168] O termo "proteína de ligação monoespecífica" refere-se a uma proteína de ligação que especificamente se liga a um alvo de antígeno.

[00169] O termo "proteína de ligação monovalente" refere-se a uma proteína de ligação que tem um sítio de ligação a antígeno.

[00170] O termo "proteína de ligação biespecífica" refere-se a uma proteína de ligação que especificamente se liga a dois alvos de antígeno diferentes. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação biespecífica se liga a dois antígenos diferentes. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação biespecífica se liga a dois diferentes epítomos no mesmo antígeno.

[00171] O termo "proteína de ligação bivalente" refere-se a uma proteína de ligação que tem dois sítios de ligação.

[00172] O termo "proteína de ligação triespecífica" refere-se a uma proteína de ligação que especificamente se liga a três diferentes alvos de antígeno. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação triespecífica se liga a três diferentes antígenos. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação triespecífica se liga a um, dois ou três diferentes epítomos no mesmo antígeno.

[00173] O termo "proteína de ligação trivalente" refere-se a uma proteína de ligação que tem três sítios de ligação. Em modalidades particulares, a proteína de ligação trivalente pode se ligar a um alvo de antígeno. Em outras modalidades, a proteína de ligação trivalente pode se ligar a dois alvos de antígeno. Em outras modalidades, a proteína de ligação trivalente pode se ligar a três alvos de antígeno.

[00174] Uma proteína de ligação "isolada" é a que foi identificada e

separada e/ou recuperada de um componente de seu ambiente natural. Os componentes contaminantes de seu ambiente natural são materiais que interfeririam no diagnóstico ou no uso terapêutico para a proteína de ligação, e podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteicos ou não proteicos. Em algumas modalidades, a proteína de ligação será purificada: (1) para mais de 95% em peso de anticorpo como especificado pelo método de Lowry, e mais preferencialmente para mais de 99% em peso, (2) em um grau suficiente para obter pelo menos 15 resíduos de sequência de aminoácido N-terminal ou interna por uso de um sequenciador de copo giratório, ou (3) até a homogeneidade por SDS-PAGE sob condições de redução ou não redução usando azul de Coomassie ou, preferencialmente, mancha de prata. Proteínas de ligação isoladas incluem a proteína de ligação *in situ* dentro de células recombinantes, desde que pelo menos um componente do ambiente natural da proteína de ligação não esteja presente.

[00175] Os termos "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado", como usados neste documento, referem-se a um composto ou espécie que é a espécie predominante presente (ou seja, em uma base molar, é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição). Em algumas modalidades, uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie compreende pelo menos de cerca de 50% (em uma base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes. Em outras modalidades, uma composição substancialmente pura compreenderá mais de cerca de 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição. Ainda em outras modalidades, a espécie é purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não podem ser detectadas na composição por métodos de detecção convencionais), em que a composição consiste

essencialmente em uma única espécie macromolecular.

[00176] O termo "epítopo" inclui qualquer determinante, preferencialmente um determinante de polipeptídeo, capaz de especificamente se ligar a um receptor de imunoglobulina ou célula T. Em determinadas modalidades, determinantes de epítopo incluem agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforil ou grupos sulfonil e, em determinadas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características de carga específicas. Um epítopo é uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo ou proteína de ligação. Em determinadas modalidades, diz-se que uma proteína de ligação especificamente liga um antígeno quando preferencialmente reconhece seu antígeno alvo em uma mistura complexa de proteínas e/ou macromoléculas. Em algumas situações, diz-se que uma proteína de ligação especificamente liga um antígeno quando a constante de dissociação de equilíbrio é $\leq 10^{-8}$ M, mais preferencialmente quando a constante de dissociação de equilíbrio é $\leq 10^{-9}$ M, e mais preferencialmente quando a constante de dissociação de equilíbrio é $\leq 10^{-10}$ M.

[00177] A constante de dissociação (K_D) de uma proteína de ligação pode ser determinada, por exemplo, por ressonância de plasmons de superfície. Geralmente, a análise por ressonância de plasmons de superfície mede interações de ligação em tempo real entre ligado (um antígeno alvo em uma matriz de biossensores) e analito (uma proteína de ligação em solução) por ressonância de plasmons de superfície (SPR) usando o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). A análise por plasmons de superfície também pode ser realizada por imobilização do analito (proteína de ligação em uma matriz de biossensores) e apresentação do ligando (antígeno alvo). O termo " K_D ", como usado neste documento, refere-se à constante de dissociação da

interação entre uma determinada proteína de ligação e um antígeno alvo.

[00178] O termo "se liga a", como usado neste documento em referência a uma proteína de ligação, refere-se à capacidade de uma proteína de ligação ou um fragmento de ligação a antígeno da mesma de se ligar a um antígeno contendo um epítipo com uma K_d de pelo menos cerca de 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, ou mais, e/ou de se ligar a um epítipo com uma afinidade que seja pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade por um antígeno não específico. Em algumas amostras, uma proteína de ligação da presente invenção se liga a dois ou mais antígenos, por exemplo, um polipeptídeo CD38 humano e de macaco cinomolgo.

[00179] Em algumas modalidades, um domínio de ligação a antígeno e/ou proteína de ligação da presente invenção "reage de forma cruzada" com polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo, por exemplo, domínios extracelulares CD38, tais como SEQ ID NO: 1 (isoforma A de CD38 humano), SEQ ID NO: 105 (isoforma E de CD38 humano) e SEQ ID NO: 30 (CD38 de macaco cinomolgo). Uma proteína de ligação ligando-se a antígeno 1 (Ag1) é "reativa de forma cruzada" ao antígeno 2 (Ag2) quando os EC_{50} s estão em um intervalo semelhante para ambos os antígenos. No presente pedido, uma proteína de ligação ligando-se a Ag1 é reativa de forma cruzada a Ag2 quando a razão de afinidade de Ag2 para afinidade de Ag1 é igual ou inferior a 10 (por exemplo 5, 2, 1 ou 0,5), as afinidades sendo medidas com o mesmo método para ambos os antígenos.

[00180] Uma proteína de ligação ligando-se o Ag1 "não é significativamente reativa de forma cruzada" a Ag2 quando as afinidades são muito diferentes para os dois antígenos. A afinidade para Ag2 pode não ser mensurável se a resposta de ligação for muito baixa.

No presente pedido, uma proteína de ligação ligando-se a Ag1 não é significativamente reativa de forma cruzada a Ag2, quando uma resposta de ligação da proteína de ligação a Ag2 é inferior a 5% da resposta de ligação da mesma proteína de ligação a Ag1 na mesma configuração experimental e na mesma concentração anticorpo. Na prática, a concentração de proteína de ligação usada pode ser o EC_{50} ou a concentração necessária para atingir o platô de saturação obtido com Ag1.

[00181] O termo "ligante", como usado neste documento, refere-se a um ou mais resíduos de aminoácido inseridos entre domínios de imunoglobulina para prover mobilidade suficiente para que os domínios das cadeias pesada e leve se dobrem em cruzamentos de imunoglobulinas de região variável dupla. Um ligante é inserido na transição entre domínios variáveis ou entre domínios variáveis e constantes, respectivamente, no nível de sequência. A transição entre domínios pode ser identificada porque o tamanho aproximado dos domínios de imunoglobulina é bem conhecido. A localização precisa de uma transição de domínio pode ser determinada localizando extensões de peptídeo que não formam elementos estruturais secundários, tais como folhas beta ou hélices alfa, como demonstrado por dados experimentais ou como pode ser assumido por técnicas de modelagem ou previsão de estrutura secundária. Os ligantes descritos neste documento são referidos como L_1 , que está localizado na cadeia leve entre o terminal C do domínio V_{L2} e o terminal N do domínio V_{L1} ; e L_2 , que é localizado na cadeia leve entre o terminal C do V_{L1} e o terminal N do domínio C_L . Ligantes de cadeia pesada são conhecidos como L_3 , que está localizado entre o terminal C do domínio V_{H1} e o terminal N do domínio V_{H2} ; e L_4 , que está localizado entre o terminal C do domínio V_{H2} e o terminal N do domínio C_{H1} .

[00182] O termo "vetor", como usado neste documento, refere-se a

qualquer molécula (por exemplo, ácido nucleico, plasmídeo ou vírus) usada para transferir informações de codificação para uma célula hospedeira. O termo "vetor" inclui uma molécula de ácido nucleico que é capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual está ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a uma molécula de DNA circular de filamento duplo na qual segmentos adicionais de DNA podem ser inseridos. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos adicionais de DNA podem ser inseridos no genoma viral. Determinados vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos com origem bacteriana de replicação e vetores epissômicos de mamíferos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não epissômicos) podem ser integrados ao genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira e, portanto, são replicados juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, determinados vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão operacionalmente ligados. Esses vetores são referidos neste documento como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente "vetores de expressão"). Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante geralmente estão na forma de plasmídeos. Os termos "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados aqui de forma intercambiável, uma vez que plasmídeo é a forma de vetor mais comumente usada. No entanto, a descrição destina-se a incluir outras formas de vetores de vírus, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados com replicação defectiva), que atendem a funções equivalentes.

[00183] A frase "célula hospedeira recombinante" (ou "célula hospedeira"), como usada neste documento, refere-se a uma célula na qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Uma célula hospedeira recombinante ou célula hospedeira destina-se a se referir

não apenas à célula em questão, mas também à progênie dessa célula. Como certas modificações podem ocorrer nas gerações seguintes devido a uma mutação ou influências ambientais, essa progênie pode não ser de fato idêntica à célula de origem, mas essas células ainda estão incluídas no escopo do termo "célula hospedeira", como usado neste documento. Uma ampla variedade de sistemas de expressão de células hospedeiras pode ser usada para expressar as proteínas de ligação, incluindo sistemas de expressão bacteriana, de levedura, baculoviral e de mamífero (bem como sistemas de expressão de exibição de fagos). Um exemplo de um vetor de expressão bacteriano adequado é pUC19. Para expressar uma proteína de ligação recombinantemente, uma célula hospedeira é transformada ou transfectada com um ou mais vetores de expressão recombinantes que transportam fragmentos de DNA que codificam as cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação, tal que as cadeias de polipeptídeo sejam expressas na célula hospedeira e, de preferência, secretadas no meio em que as células hospedeiras são cultivadas, do qual a proteína de ligação pode ser recuperada.

[00184] O termo "transformação", como usado neste documento, refere-se a uma alteração nas características genéticas de uma célula, e uma célula foi transformada quando foi modificada para conter um novo DNA. Por exemplo, uma célula é transformada quando é geneticamente modificada de seu estado nativo. Após a transformação, o DNA transformador pode recombinar-se com aquele da célula integrando-se fisicamente em um cromossomo da célula, ou pode ser mantido de forma transiente como um elemento epissômico sem ser replicado, ou pode replicar-se de forma independente como um plasmídeo. Uma célula é considerada ter sido transformada de maneira estável quando o DNA é replicado com a divisão da célula. O termo "transfecção", como usado neste documento, refere-se à captação de

DNA estrangeiro ou exógeno por uma célula, e uma célula foi "transfectada" quando o DNA exógeno foi introduzido dentro da membrana celular. Várias técnicas de transfecção são bem conhecidas na técnica. Tais técnicas podem ser usadas para introduzir uma ou mais moléculas de DNA exógeno em células hospedeiras adequadas.

[00185] O termo "de ocorrência natural", como usado neste documento e aplicado a um objeto, refere-se ao fato de que o objeto pode ser encontrado na natureza e que não foi manipulado pelo homem. Por exemplo, um polinucleotídeo ou polipeptídeo que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem é de ocorrência natural. Da mesma forma, "de ocorrência não natural", como usado neste documento, refere-se a um objeto que não é encontrado na natureza ou que foi estruturalmente modificado ou sintetizado pelo homem.

[00186] Como aqui usado, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais; aminoácidos e análogos não naturais, tais como aminoácidos α - e α -dissubstituídos, aminoácidos N-alkil, ácido láctico e outros aminoácidos não convencionais também podem ser componentes adequados para as cadeias de polipeptídeo das proteínas de ligação. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metil-histidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (por exemplo, 4-hidroxiprolina). Na notação polipeptídica usada aqui, a direção à esquerda é a direção do terminal amino e a direção à direita é a direção do terminal carboxila, de acordo com o uso e a convenção padrão.

[00187] Resíduos de ocorrência natural podem ser divididos em classes com base em propriedades comuns de cadeia lateral:

- (1) hidrofóbicos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- (2) hidrofílicos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr;
- (3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- (4) hidrofóbicos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- (5) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (6) ácidos: Asp, Glu;
- (7) básicos: His, Lys, Arg;
- (8) resíduos que influenciam a orientação de cadeia: Gly, Pro;
- (9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; e
- (10) hidrofóbicos aromáticos: Phe, Trp, Tyr.

[00188] Substituições de aminoácido conservadoras podem envolver a troca de um membro de uma dessas classes por outro membro da mesma classe. Substituições não conservadoras podem envolver a troca de um membro de uma dessas classes por um membro de outra classe.

[00189] Uma pessoa versada será capaz de determinar variantes adequadas das cadeias de polipeptídeo das proteínas de ligação usando técnicas bem conhecidas. Por exemplo, um versado na técnica pode identificar áreas adequadas de uma cadeia de polipeptídeo que podem ser alteradas sem destruir a atividade por direcionamento de regiões que não se acredita serem importantes para a atividade. Alternativamente, um versado na técnica pode identificar resíduos e porções das moléculas que são conservados entre polipeptídeos semelhantes. Além disso, mesmo áreas que podem ser importantes para a atividade biológica ou para a estrutura podem estar sujeitas a substituições de aminoácidos conservadoras sem destruir a atividade

biológica ou afetar adversamente a estrutura do polipeptídeo.

[00190] O termo "paciente", como usado neste documento, inclui seres humanos e animais (por exemplo, mamíferos, tais como cães, porcos, cavalos, gatos, vacas etc.).

[00191] Os termos "tratamento" ou "tratar", como usado neste documento, referem-se a tratamento terapêutico e a medidas profiláticas ou preventivas. Aqueles em necessidade de tratamento incluem aqueles que sofrem de um distúrbio, bem como aqueles que são propensos a ter o distúrbio ou aqueles em que o distúrbio deve ser prevenido. Em modalidades particulares, as proteínas de ligação podem ser usadas para tratar seres humanos com câncer, ou seres humanos suscetíveis ao câncer, ou melhorar o câncer em um indivíduo humano. As proteínas de ligação também podem ser usadas para prevenir o câncer em um paciente humano. Em modalidades particulares, o câncer é mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma, câncer de mama, tal como câncer de mama Her2+, câncer de próstata, linfoma de células B do centro germinativo ou leucemia linfoblástica aguda de células B.

[00192] Os termos "composição farmacêutica" ou "composição terapêutica", como usado neste documento, referem-se a um composto ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado adequadamente a um paciente.

[00193] O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" ou "veículo fisiologicamente aceitável", como usado neste documento, refere-se a um ou mais materiais de formulação adequados para realizar ou melhorar a entrega de uma proteína de ligação.

[00194] Os termos "quantidade eficaz" e "quantidade terapeuticamente eficaz", quando usados em referência a uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais proteínas de ligação, referem-se a uma quantidade ou dosagem suficiente para

produzir um resultado terapêutico desejado. Mais especificamente, uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade de uma proteína de ligação suficiente para inibir, por algum período de tempo, um ou mais dos processos patológicos clinicamente definidos associados à condição a ser tratada. A quantidade eficaz pode variar dependendo da proteína de ligação específica que está sendo usada, e também depende de uma variedade de fatores e condições relacionados ao paciente sendo tratado e à gravidade do distúrbio. Por exemplo, se a proteína de ligação tiver que ser administrada *in vivo*, fatores como idade, peso e saúde do paciente, bem como as curvas de resposta à dose e os dados de toxicidade obtidos no trabalho pré-clínico em animais estariam entre os fatores considerados. A determinação de uma quantidade eficaz ou de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma determinada composição farmacêutica está bem dentro da habilidade dos versados na técnica.

[00195] Uma modalidade da descrição provê uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação.

II. Proteínas de Ligação Anti-CD38

[00196] Determinados aspectos da presente invenção referem-se a proteínas de ligação que compreendem um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação são monoespecíficas e/ou monovalentes, biespecíficas e/ou bivalentes, triespecíficas e/ou trivalentes, ou multiespecíficas e/ou multivalentes.

[00197] Uma variedade de recursos de proteínas de ligação monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas exemplificativas é descrita neste documento. Por exemplo, em algumas modalidades, uma proteína de ligação ou fragmento de ligação a antígeno da mesma reage

de maneira cruzada com CD38 humano (por exemplo, um polipeptídeo de isoforma A e/ou isoforma E de CD38 humano) e CD38 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação induz apoptose de uma célula CD38+. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação recruta uma célula T para uma célula CD38+ e opcionalmente ativa a célula T (por exemplo, através de estimulação e/ou coestimulação de TCR).

[00198] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de

ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 CDRs de uma sequência de domínio VH e/ou VL de anticorpo de mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5, mAb6, mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA, mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A, mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA, mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA, mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A, ou mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA, como mostrado na Tabela G, H ou I.

[00199] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID

NO: 36).

[00200] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em outras modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia

pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

[00201] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCCKAS (SEQ ID NO: 87), ou QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); em que FR2

compreende a sequência MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) ou MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); em que FR3 compreende a sequência NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 93) ou NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 94); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 96). Em algumas modalidades, o domínio VL compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4; em que FR1 compreende a sequência DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS (SEQ ID NO: 97); em que FR2 compreende a sequência MHWYQQKPGQPRLLIY (SEQ ID NO: 99); em que FR3 compreende a sequência SRATGIPARFSGSGSGTDFLTISPLEDFAVYYC (SEQ ID NO: 101); e em que FR4 compreende a sequência FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 103).

[00202] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos

92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos

96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

[00203] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos

96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100%

idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

[00204] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

[00205] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 e/ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido

de SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 e/ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22 e/ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 e/ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 e/ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16.

[00206] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação

da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16.

[00207] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); ou um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, as proteínas de ligação compreendem um sítio de ligação a antígeno compreendendo: um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); e um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-

L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

[00208] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 89); em que FR2 compreende a sequência MHWVRQAPGKGLEWVAV (SEQ ID NO: 92); em que FR3 compreende a sequência YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 95); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96). Em algumas modalidades, o domínio VL compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4; em que FR1 compreende a sequência AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS (SEQ ID NO: 98); em que FR2 compreende a sequência GWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 100); em que FR3 compreende a sequência SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYC (SEQ ID NO: 102); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 104).

[00209] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e/ou o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos

88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

[00210] Em algumas modalidades, o domínio VH compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e o domínio VL compreende uma sequência de aminoácido que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10. Em algumas modalidades, o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9; e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

[00211] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 ou uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 12. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 12.

[00212] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 sequências CDR de

uma sequência de anticorpo mostrada na Tabela G. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 sequências CDR, uma sequência de domínio VH e/ou uma sequência de domínio VL de uma sequência de anticorpo mostrada na Tabela H. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 sequências CDR, uma sequência de domínio VH e/ou uma sequência de domínio VL de uma sequência de anticorpo mostrada na Tabela I. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende 1, 2, 3 ou 4 sequências de polipeptídeo mostradas na Tabela I.

Tabela G: Sequências CDR de proteínas de ligação anti-CD38

Ab	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_L1	CDR_L2	CDR_L3
mAb1	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb2	GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37)	IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39)	GAS (SEQ ID NO: 40)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb3	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb4	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb5	GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31)	IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32)	ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33)	ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34)	LAS (SEQ ID NO: 35)	QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36)
mAb6	GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41)	IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42)	ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43)	QGIRND (SEQ ID NO: 44)	AAS (SEQ ID NO: 45)	LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46)

Tabela H. Sequências de domínio variável de anti-CD38 (mAb1-7) e outras proteínas de ligação.

Ab	VH (PROTEÍNA)	VL (PROTEÍNA)
mAb1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSC KAS <u>GYTFTSF</u> <u>NMHWVKETPGQGLEWIGYIYPG</u> <u>NGGT</u> NYNQKFQKATLTADTSS STAYMQISSLTSEDSAVYFC <u>ART</u> <u>GGLRRAYFTY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 5)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASE <u>SVDSYGN</u> GFMHWYQQKP GQPPKLLIY <u>LASN</u> LESGVPARFS GSGSRDFTLTIDPVEADDAATY YC <u>QONKEDPWT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)
mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS <u>GYTFTSY</u> AMHWVKEAPGQR LEWIGYI <u>YPGQGGT</u> NYNQKFQ RATLTADTSASTAYMELSSLRSE DTAVYFC <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WG QGLTVTVSS (SEQ ID NO: 13)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR AS <u>QSVSSYGQGF</u> MHWYQQKPG QPPRLLIY <u>GASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 14)
mAb3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS <u>GYTFTSF</u> <u>NMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPG</u> <u>NGGT</u> NYNQKFQGRATLTADTSA STAYMELSSLRSEDTAVYFC <u>ART</u> <u>GGLRRAYFTY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 17)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR AS <u>SVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb4	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSC KAS <u>GYTFTSF</u> <u>NMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPG</u> <u>NGGT</u> NYNQKFQGRATLTADTSA STAYMEISSLRSEDTAVYFC <u>ART</u> <u>GGLRRAYFTY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 21)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR AS <u>SVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb5	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSC KAS <u>GYTFTSF</u> <u>NMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPG</u> <u>NGGT</u> NYNQKFQGRATLTADTSA STAYMEISSLRSEDTAVYFC <u>ART</u> <u>GGLRRAYFTY</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 23)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR AS <u>SVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLE PEDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
mAb6	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AAS <u>GFTFSSYG</u> MHWVRQAPGK GLEWVAVI <u>WYDGSNK</u> YYADSVK GRFTISGDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYC <u>ARMFRGAFDY</u> WGQ GTLTVTVSS (SEQ ID NO: 9)	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RAS <u>QGIRND</u> LGWYQQKPGKAP KLLIY <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISGLQPEDSATYYC <u>LQ</u> <u>DYIYYPT</u> FGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 10)
mAb7	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSC KASGYTFTDYWMQWVKQRPQG GLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQ KATLTADKSSKTVYMHLSLASE DSAVYYCARGDYYGSNSLDYWG QGTSVTVTVSS (SEQ ID NO: 47)	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITC KASQDVSTVVAWYQQKPGQSP RRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGA GTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQ HYSPPYTFGGGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 48)

Ab	VH (PROTEÍNA)	VL (PROTEÍNA)
Anti-CD28 _{sup} p	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KAS GYTFTSY YIHWVRQAPGQG LEWIGSI YPGNVNT NYAQKFQGR ATLTVDTISISTAYMELSRRLSDDT AVYYCT TRSHYGLDWNFDV WGK GTTVTVSS (SEQ ID NO: 49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QAS QNIYVWL NWYQQKPGKAP KLLIY KAS NLHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDATYYC QQ GQTPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 50)
Anti-CD28 _{cvn}	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCT VS GFSLS DYGVHWVRQPPGKGL EWLGVI WAGGGT NYNPSLKSRL TISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTA VYYC ARDKGY SYYSMDYWGQ GTTVTVSS (SEQ ID NO: 51)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC RAS ESVEYYVTS LMQWYQQKP GQPPKLLIF AAS NVESGVPARFS GSGSGTDFTLTINPVEANDVANY YC QOSRKVPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 52)
Anti-CD3 _{mid}	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AAS GFTFTKAW MHWVRQAPGK QLEWVAQ IKDKSNS YATYYADS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC RGVYYALSPFDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 53)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSS QSLVHNNANTY LSWYLQKP GQSPQSLIY KVS NRFSGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC GQGTQYPFT FGSGTKVEI K (SEQ ID NO: 54)
Anti-CD3 _{low}	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AAS GFTFTKAW MHWVRQAPGK GLEWVAQ IKDKSNS YATYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC RGVYYALSPFDY WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 84)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSS QSLVHNNANTY LSWYLQKP GQSPQSLIY KVS NRFSGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC GQGTQYPFT FGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 85)

[00213] Nota: sequências CDR estão em negrito e sublinhadas nas sequências de aminoácidos acima.

Tabela I. Sequências de comprimento total de proteínas de ligação.

mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(hole) FALA Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSC KASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTISISTAYMELSRRLSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVT SSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ GTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLGL	SEQ ID NO: 60
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVH NNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFS	SEQ ID NO: 61

(por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQGQ TYPYTFGQGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
mAb2 IgG4(knob) FALA Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLG	SEQ ID NO: 62
mAb2 Cadeia leve 2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS YGQGMFWYQQKPGQPPRLIYGASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 63
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) LALA P329A Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTITVTVSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYALSPFDYWGQGTLLTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	SEQ ID NO: 64

	FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG	
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 61
mAb2 IgG1(knob) LALA P329A Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG	SEQ ID NO: 65
mAb2 Cadeia leve 2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 63
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) NNSA Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVTV SSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGG GTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF	SEQ ID NO: 66

	FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 61
mAb2 IgG1(knob) NNSA Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHNTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 67
CD38VH1 Cadeia leve 2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 63
mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(hole) FALA Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 60
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 61

mAb6 IgG4(knob) FALA Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYCKKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC QEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLG	SEQ ID NO: 68
mAb6 Light2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIT NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCL QDYIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	SEQ ID NO: 69
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) LALA P329A Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 64
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 61
mAb6 IgG1(knob) LALA P329A Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGKTYICNVNHHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE	SEQ ID NO: 70

	EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	
mAb6 Light2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 69
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) NNSA Cadeia pesada 1 (por exemplo, uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 66
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 61
mAb6 IgG1(knob) NNSA Cadeia pesada 2 (por exemplo, uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG	SEQ ID NO: 71
mAb6 Light2 (por exemplo, uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 69

triespecífica da presente invenção)		
anticorpo monovalente mAb1		
mAb1 cadeia pesada	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTF TSF NMHWVKETPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYN QKFKGKATLTADTSSSTAYMQISSLTSEDS AVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 7
mAb1 cadeia leve	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YNGFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 8
anticorpo monovalente mAb2		
mAb2 cadeia pesada	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLR EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGLTV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPLPEEKISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	SEQ ID NO: 15
mAb2 cadeia leve	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSS YGQGMHWYQQKPGQPPRLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 16

anticorpo monovalente mAb3		
mAb3 cadeia pesada	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSF NMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGTNYN QKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSED AVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 19
mAb3 cadeia leve	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YNGFMHWYQQKPGQPPRLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticorpo monovalente mAb4		
mAb4 cadeia pesada	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKASGYTF TSF NMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPGNGGTNYN QKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSED AVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 22
mAb4 cadeia leve	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YNGFMHWYQQKPGQPPRLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticorpo monovalente mAb5		

mAb5 cadeia pesada	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTF TSF NMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGTNYN QKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSED AVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 24
mAb5 cadeia leve	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDS YGNFMHWYQQKPGQPPRLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYY CQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREKAV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticorpo monovalente mAb6		
mAb6 cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF SSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSN KYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL AGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	SEQ ID NO: 11
mAb6 cadeia leve	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP S RFGSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQ DYIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREKAVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	SEQ ID NO: 12
anticorpo monovalente mAb7		

mAb7 cadeia pesada	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTF TDYWMQWVKQRPQGQGLEWIGTIYPGDGD TGAYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLA SEDSAVYYCARGDYYSNSLDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	SEQ ID NO: 107
mAb7 cadeia leve	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVS TVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRIIGVPD RFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ HYSPPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	SEQ ID NO: 106

Tabela J: Sequências de polinucleotídeo de comprimento total de proteínas de ligação.

mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(hole) FALA Cadeia pesada 1 (por exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAA GGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCG CCAGGCCCTGGACAGGGACTGGAATGG ATCGGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGA ACACCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGTGGACACCAGC ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGC GGCTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTA CTACTGCACCCGGTCCCACTACGGCCTG GATTGGAAGTTCGACGTGTGGGGCAAGG GCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGCCA GGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGAC TGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CACCAAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCTGGAAAGCAGCTGGAATGGG TGGCCAGATCAAGGACAAGAGCAACAG CTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC	SEQ ID NO: 72

	CGTGTACTACTGTCGGGGCGTGTACTAT GCCCTGAGCCCCTTCGATTACTGGGGCC AGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAGTCG GACCGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTG TTCCCTCTGGCCCCTTGCAGCAGAAGCA CCAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCTG CCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTC TGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGC CGTGCTCCAGAGCAGCGGCCTGTACTCT CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCA GCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTG TAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTAAGT ACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGC CCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCTCCGTG TTCCTGTTCCCCCAAGGCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGG AAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCC GCGAGCCTCAAGTGTGTACCCTGCCCCC TAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCT TCTACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACA GCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAA GCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAG GAAGGCAACGTGTTCAAGCTGCTCCGTGA TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGA GCCTGAGCGTGACACCTGGACAGCCTGC CAGCATCAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGC CTGGTGCACAACAACGCCAACACCTACCT GAGCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAG AGCCCCCAGTCCCTGATCTACAAGGTGT CCAACAGATTCAGCGGCGTGCCCGACAG ATTCTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGAC TTCACCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAG CCGAGGACGTGGGCGTGTACTATTGTGG CCAGGGCAGCCAGTACCCCTTCACCTTT GGCAGCGGCACCAAGGTGGAAATCAAGG GCCAGCCCAAGGCCGCCCCCGACATCCA GATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGTCT GCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA	SEQ ID NO: 73

	CCTGTCAGGCCAGCCAGAACATCTACGT GTGGCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACA AGGCCAGCAACCTGCACACCGGCGTGCC CAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACATTGCCACCTACTAC TGCCAGCAGGGCCAGACCTACCCCTACA CCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAAT CAAGACCAAGGGCCCCAGCCGTACGGTG GCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCAC CTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCAC AGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACT TCTACCCCCGCGAGGCCAAAGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGG ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCG AAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCC CGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAG TGT	
mAb2 IgG4(knob) FALA Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA GGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAA AGAGGCCCTGGCCAGAGACTGGAATGG ATCGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCG GCACCAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACAAGC GCCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTA CTTCTGTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGG CGGGCCTACTTTACCTATTGGGGCCAGG GCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACAAAGGGCCCATCGGTGTTCCCTCTG GCCCCTTGCAGCAGAAGCACCAGCGAAT CTACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACAAGCG GCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTCCA GAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGC GTCGTGACAGTGCCAGCAGCAGCCTGG GCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGCGGGTGGAAATCTAAGTACGGCCCTC CCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTGAAGC TGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTT CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGA TCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGT GGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCC GAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAA	SEQ ID NO: 74

	GCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGA GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGC CTGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGC CTCAAGTGTATACCCTGCCCCCTTGCCAG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCC AGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGC TCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAA CGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
mAb2 Cadeia leve 2 (por exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCA CCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGC CACCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGC GTGTCCAGCTACGGCCAGGGCTTCATGC ACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCC CCCAGACTGCTGATCTATGGCGCCAGC AGCAGAGCCACAGGCATCCCCGCCAGAT TTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTT CACCCTGACAATCAGCCCCCTGGAACCC GAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGAACAAAGAGGACCCCTGGACCTTCGG CGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGT ACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCT TCCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTG AACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGG TGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCA GAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACC GAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGTCCAA GGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTAC GCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGT CTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCG GGGCGAGTGC	SEQ ID NO: 75
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) LALA P329A Cadeia pesada 1 (por exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAA GGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCG CCAGGCCCTTGACAGGGACTGGAATGG ATCGGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGA ACACCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGTGGACACCAGC ATCAGCACC GCCTACATGGAAGTGAAGCC GGCTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTA CTACTGCACCCGGTCCCACTACGGCCTG	SEQ ID NO: 76

	GATTGGAAGCTTCGACGTGTGGGGCAAGG GCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGCCA GGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGAC TGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CACCAAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCCTGGAAAGCAGCTGGAATGGG TGGCCCAGATCAAGGACAAGAGCAACAG CTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTAATACTGTCTGGGGCGTGTAATA GCCCTGAGCCCCCTTCGATTACTGGGGCC AGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAGTCG GACCGCCAGCACAAAGGGCCCCAGCGTG TTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTG CCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTCTGGAATTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTTCCAGC TGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAAGCA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC TTGTCTGCCCCCGAAGCCGCCGGAGGC CCTTCCGTGTTCTCTGTTCCCCCAAAGCC CAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATG TGTCCACAGAGGACCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG CACACGCGCAAGACCAAGCCAAGAGAGG AACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCC CATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTGCA CACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACTACAAGACCAACCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCT GGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTACGCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGC	
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 73

(por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)		
mAb2 IgG1(knob) LALA P329A Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA GGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAA AGAGGCCCTGGCCAGAGACTGGAATGG ATCGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCG GCACCAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACAAGC GCCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTA CTTCTGTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGG CGGGCCTACTTTACCTATTGGGGCCAGG GCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTG GCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCG GAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA GGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCA GTCCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC GTCGTGACAGTGCCAGCAGCTCTCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGC CCCCGAAGCCGCGGAGGCCCTTCCGTG TTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCCGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGTACAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGGCCGCCCCCATCGAGAAA ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCC GCGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCC ATGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGTGGTGTCTGGTGAAGGCT TCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACA GCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAG CTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGAT	SEQ ID NO: 77

	GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
mAb2 Cadeia leve 2 (por exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 75
mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) NNSA Cadeia pesada 1 (por exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AGGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAA GGTGTCTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCG CCAGGCCCTGGACAGGGACTGGAATGG ATCGGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGA ACACCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGTGGACACCAGC ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCC GGCTGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTA CTACTGCACCCGGTCCCACTACGGCCTG GATTGGAAGTTCGACGTGTGGGGCAAGG GCACCACCGTGACAGTGTCTAGCAGCCA GGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGCGGA GTGGTGCAGCCTGGCAGAAGCCTGAGAC TGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CACCAAGGCCTGGATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCTGGAAAGCAGCTGGAATGGG TGGCCCAGATCAAGGACAAGAGCAACAG CTACGCCACCTACTACGCCGACAGCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACG ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTAATACTGTCTGGGGCGTGTACTAT GCCCTGAGCCCCTTCGATTACTGGGGCC AGGGAACCCTCGTGACCGTGTCTAGTCG GACCGCCAGCACAAAGGGCCCCAGCGTG TTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCA CATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTG CCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTCTGGAATTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGACACCTTTCCAGC TGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAGCA GCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCC TTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGGGAGGC CCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCC CAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATG	SEQ ID NO: 78

	TGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGG AACAGTACAACAATGCCTCCCGGGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCC CATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCCCGCGAACCCCAAGGTGTGCA CACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCT GGTGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCAGAAAGTCCCTGAGCCTG AGCCCCGGC	
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 73
mAb2 IgG1(knob) NNSA Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCG AAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA GGTGTCTTGCAAGGCCAGCGGCTACACC TTTACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAA AGAGGCCCTGGCCAGAGACTGGAATGG ATCGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCG GCACCAACTACAACCAGAAGTTCCAGGG CAGAGCCACCCTGACCGCCGATACAAGC GCCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCA GCCTGCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTA CTTCTGTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGG CGGGCCTACTTTACCTATTGGGGCCAGG GCACCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA	SEQ ID NO: 79

	ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCAC CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATG TTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AATGCCTCCCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TGCCGGGATGAGCTGACCAAGAATCAAG TCAGCCTGTGGTGCCTGGTAAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC CGACGGCTCCTTCTTCTCTACTCAAAC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT	
mAb2 Cadeia leve 2 (por exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 75
mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
CD28supxCD3mid IgG4(hole) FALA Cadeia pesada 1 (por exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 72
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 73

mAb6 IgG4(knob) FALA Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGA GGCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGA GACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCAC CTTCAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTG CGCCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAAT GGGTGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAG CAACAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAACA GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAA CAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCCAGAATGTTTCAGAGGC GCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAC TCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCT TGCAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAG CCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTA CTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGG AACTCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTG ACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCA AGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGG GTGGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCC CTCCTTGCCCAGCCCCTGAAGCTGCCGG CGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGT GGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTG CAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AAGTGCAACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGG GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC AGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAAGT GTATACCCTGCCCCCTTGCCAGGAAGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGCGA CATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGC CAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCC CCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATT CTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACA AGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTT CAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC TCTGTCCCTGGGC	SEQ ID NO: 80
mAb6 Light2 (por exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCA GCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGC ATCCGGAACGACCTGGGCTGGTATCAGC AGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCT	SEQ ID NO: 81

proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	GATCTACGCCGCTAGCTCTCTGCAGTCC GGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCG GCTCCGGCACCAGACTTCACCCTGACAAT CTCTGGCCTGCAGCCCCGAGGACAGCGCC ACCTACTACTGTCTGCAAGACTACATCTA CTACCCACCTTCGGCCAGGGCACCAG GTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTC CCAGCGTGTTTCATCTTCCCACCTAGCGAC GAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTG TCGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCC CGCGAGGCCAAAGTGCAAGTGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA GGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAG GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACC CACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCA AGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGT	
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) LALA P329A Cadeia pesada 1 (por exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 76
CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 73
mAb6 IgG1(knob) LALA P329A Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGA GGCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGA GACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCAC CTTCAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTG CGCCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAAT GGGTGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAG CAACAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAACA GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAA CAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCCAGAATGTTTCAGAGGC GCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAC TCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCT	SEQ ID NO: 82

	AGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAG CCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTA CTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGG AATTCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGC GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGA CAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGTCTGCCCCCGAAG CCGCCGGAGGCCCTTCCGTGTTCTGTGTT CCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATG ATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGCG TGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCAACGCCAAGACCAA GCCAAGAGAGGAACAGTACAACAGCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGA GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGGCCGCCCCCATCGAGAAAACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAAC CCCAGGTGTACACACTGCCCCCATGCAG GGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGTGGTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCC CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGA CCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAG TGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAA CGTGTTCAAGCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
mAb6 Light2 (bor exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 81
mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA		
CD28supxCD3mid IgG1(hole) NNSA Cadeia pesada 1 (bor exemplo, codificando uma segunda cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 78

CD28supxCD3mid Cadeia leve 1 (por exemplo, codificando uma primeira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 73
mAb6 IgG1(knob) NNSA Cadeia pesada 2 (por exemplo, codificando uma terceira cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGA GGCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGA GACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCAC CTTCAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTG CGCCAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAAT GGGTGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAG CAACAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAG GGCCGGTTCACCATCAGCGGCGACAACA GCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAA CAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCCAGAATGTTTCAGAGGC GCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAC TCGTGACCGTGTCTAGTGCGTCGACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT TGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG AGGTCAAGTTCAACTGGTATGTTGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAATGCCTC CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAATCAAGTCAGCCTGTG GTGCCTGGTAAAAGGCTTCTATCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACTCAAACTCACCGTGGA	SEQ ID NO: 83

	CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGT	
mAb6 Light2 (por exemplo, codificando uma quarta cadeia de polipeptídeo de uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção)	VER ACIMA.	SEQ ID NO: 81

Polipeptídeos CD38

[00214] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende um sítio de ligação a antígeno que liga um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo. Ensaio exemplificativos para determinar se um sítio de ligação a antígeno liga um antígeno são descritos neste documento e conhecidos na técnica. Em algumas modalidades, a ligação é determinada por ensaio ELISA, por exemplo, como descrito acima. Em algumas modalidades, a ligação é determinada por ensaio SPR, por exemplo, como descrito acima. Em algumas modalidades, a ligação é determinada por ensaio de citometria de fluxo usando células expressando um polipeptídeo CD38 em sua superfície celular, por exemplo, como descrito acima. Ver, por exemplo, Exemplos 1, 3 e 4.

[00215] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga um polipeptídeo purificado ou fragmento do mesmo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e/ou 30 (por exemplo, como medido por ELISA ou SPR). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga a polipeptídeo ou compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 e/ou 30 quando expressa na superfície de uma célula (por exemplo, como medido por citometria de fluxo).

[00216] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção se liga a um polipeptídeo de isoforma A de CD38 (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção se liga a um polipeptídeo de isoforma E de CD38 (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105 e não compreendendo a sequência de aminoácido total de SEQ ID NO: 1, que consiste na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105, ou que consiste essencialmente na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção se liga a um polipeptídeo de isoforma A de CD38 (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) e um polipeptídeo de isoforma E de CD38 (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105 e não compreendendo a sequência de aminoácido total de SEQ ID NO: 1, que consiste na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105, ou que consiste essencialmente na sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105). Sem desejar estar ligado à teoria, acredita-se que a ligação a um polipeptídeo de isoforma E de CD38 pode ser vantajosa, por exemplo, no direcionamento de uma proteína de ligação da presente invenção a célula(s) expressando um polipeptídeo de isoforma E de CD38.

Sequência de polipeptídeo de domínio extracelular de isoforma A de CD38 humana

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAF
KGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQ
VQRDMFTLEDTLGGLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNN
PVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRKIFDKNSTFGSVEVHN
LQPEKVQTLQAWVIHGGREDSDLCQDPTIKELESIISKRNIFSCCKNI
YRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO: 1).

Sequência de polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAF
KGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQ
VQRDMFTLEDTLGLYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNN
PVSVFWKTVSRRHFWECGSP (SEQ ID NO: 105).

[00217] Em algumas modalidades, o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30.

Sequência de polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo

RWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDA
FKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLWSRIKDLAHQFT
QVQRDMFTLEDMLLGLYLADDLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSN
NPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVH
NLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCK
NIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI (SEQ ID NO: 30).

Proteínas de ligação multiespecíficas (por exemplo, biespecífica, triespecífica ou multiespecífica) que ligam polipeptídeos CD38

[00218] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é uma proteína de ligação biespecífica compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um ou mais polipeptídeos CD38 e um segundo sítio de ligação a antígeno que liga um antígeno alvo diferente. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é uma proteína de ligação biespecífica compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um ou mais polipeptídeos CD38 e um segundo sítio de ligação a antígeno que liga um ou mais polipeptídeos CD38.

[00219] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um ou mais

polipeptídeos CD38, um segundo sítio de ligação a antígeno, e um terceiro sítio de ligação a antígeno. Por exemplo, em algumas modalidades, um dos sítios de ligação a antígeno liga um ou mais polipeptídeo(s) CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo e/ou humano), e um ou dois dos sítios de ligação a antígeno liga uma proteína de superfície de célula T. Em algumas modalidades, um dos sítios de ligação a antígeno liga um ou mais polipeptídeo(s) CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo e/ou humano), um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 humano, e um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 humano. Polipeptídeos CD3 e CD28 humanos são conhecidos na técnica. As sequências de aminoácido de domínios variáveis de anticorpo exemplificativos e não limitantes que ligam polipeptídeos CD3 e CD28 humanos são providos neste documento.

[00220] Em algumas modalidades, são providas neste documento proteínas de ligação compreendendo três sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma ou mais proteínas alvo. Em algumas modalidades, pelo menos um dos três sítios de ligação a antígeno liga um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo CD38 humano compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, e/ou o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que liga um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo e dois sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma proteína de superfície de célula T (por exemplo, um polipeptídeo CD28 humano e/ou um polipeptídeo CD3

humano).

[00221] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga uma ou mais proteínas alvo de tumor (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38) e uma ou mais proteínas alvo de célula T. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é capaz de ligar uma proteína alvo de tumor (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38) e dois diferentes epítomos em uma única proteína alvo de célula T. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é capaz de ligar uma proteína alvo de tumor (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38) e duas proteínas alvo de célula T diferentes (por exemplo, CD28 e CD3). Em algumas modalidades, a proteína de ligação é capaz de ligar uma proteína alvo de célula T e dois diferentes epítomos em uma única proteína alvo de tumor (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38). Em algumas modalidades, a proteína de ligação é capaz de ligar uma proteína alvo de célula T e duas proteínas alvo de tumor diferentes (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38 e outra proteína alvo de tumor). Em algumas modalidades, as primeira e segunda cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação formam dois sítios de ligação a antígeno que direcionam duas proteínas alvo de célula T, e as terceira e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação formam um sítio de ligação a antígeno que liga um ou mais polipeptídeo(s) CD38. Em algumas modalidades, as primeira e segunda cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação formam dois sítios de ligação a antígeno que direcionam duas proteínas alvo de tumor (por exemplo, um ou mais polipeptídeo(s) CD38 e outra proteína alvo de tumor), e as terceira e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação formam um sítio de ligação a antígeno que liga uma célula T proteína alvo. Em algumas modalidades, as uma ou mais proteínas alvo de célula T são um ou mais de CD3 e CD28.

[00222] Em algumas modalidades, as proteínas de ligação

especificamente se ligam a um ou mais polipeptídeo(s) CD38 e uma ou mais proteínas alvo em uma célula T incluindo um complexo receptor de célula T. Essas proteínas de ligação acopladoras de célula T são capazes de recrutar células T transientemente para células alvo e, ao mesmo tempo, ativar a atividade citolítica das células T. Exemplos de proteínas alvo em células T incluem, mas sem limitação, CD3 e CD28, entre outras. Exemplos adicionais de tais alvos de antígeno ou proteínas alvo são providos acima. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação triespecíficas podem ser geradas combinando o domínio de ligação a antígenos de dois ou mais anticorpos monoespecíficos (anticorpos de origem) em um anticorpo.

Formatos de proteína de ligação biespecífica

[00223] Em algumas modalidades, a proteína de ligação da descrição é uma proteína de ligação biespecífica e/ou bivalente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam quatro sítios de ligação a antígeno que ligam um ou mais (por exemplo, dois) alvos de antígeno ou proteínas alvo diferentes (por exemplo, tendo uma estrutura descrita na Publicação Internacional Nº. WO2012/135345). Em algumas modalidades, a proteína de ligação é bivalente e/ou biespecífica. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é tetravalente e/ou tetraespecífica. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é tetravalente e/ou biespecífica. Em algumas modalidades, pelo menos um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de polipeptídeo CD38 humano e/ou de macaco cinomolgos).

[00224] Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende duas cadeias de polipeptídeo tendo uma estrutura representada pela fórmula:



e duas cadeias de polipeptídeo têm uma estrutura

representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é o domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

Fc compreende uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} , C_{H3} ;

L_1 , L_2 , L_3 , e L_4 são ligantes de aminoácido;

e em que os polipeptídeos de fórmula I e os polipeptídeos de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno. Em algumas modalidades, V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno.

[00225] Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende duas cadeias de polipeptídeo que formam dois sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende

V_{L1} - L_1 - V_{L2} - L_2 - CL - Fc

e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende

V_{H2} - L_3 - V_{H1} - L_4 - C_{H1} - Fc

em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

CL é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é o domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

Fc compreende uma região de dobradiça de imunoglobulina e Domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} , C_{H3} ; e

L_1 , L_2 , L_3 , e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que os primeiro e segundo polipeptídeos formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno. Em algumas modalidades, V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de

antígeno.

[00226] Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende três cadeias de polipeptídeo que formam dois sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende

$V_{L1}-L_1-V_{L2}-L_2-CL$

uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende

$V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-C_{H1}-Fc$

a terceira cadeia de polipeptídeo compreende um anticorpo

Fc region

em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

CL é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é o domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

Fc compreende uma região de dobradiça de imunoglobulina e Domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina CH_2 , CH_3 ; e

L_1 , L_2 , L_3 , e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que os primeiro e segundo polipeptídeos formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno. Em algumas modalidades, V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno.

[00227] Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma primeira cadeia de polipeptídeo compreendendo uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreendendo uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno. Em algumas modalidades, V_{H2} e V_{L2} formam um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, e V_{H1} e V_{L1} formam um domínio de ligação a antígeno que liga outro alvo de antígeno.

[00228] Em qualquer uma das proteínas de ligação biespecíficas descritas acima, o antígeno alvo que não CD38 pode ser qualquer um dos seguintes alvos de antígeno exemplificativos: A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (também conhecido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (também conhecido como MCP-1), CCL3 (também conhecido como MIP-1a), CCL4 (também conhecido como MIP-1b), CCL5 (também conhecido como RANTES), CCL7 (também conhecido como MCP-3), CCL8 (também conhecido como mcp-2), CCL11 (também conhecido como eotaxina), CCL15 (também conhecido como MIP-1d), CCL17 (também conhecido como TARC), CCL19 (também conhecido como MIP-3b), CCL20 (também conhecido como MIP-3a), CCL21 (também conhecido como MIP-2), CCL24 (também conhecido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (também conhecido como TECK), CCL26 (também conhecido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (também conhecido como FCER2, um receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (também conhecido como B7-1), CD86 (também conhecido como B7-2), CD122, CD137 (também conhecido como 41BB), CD137L, CD152 (também conhecido como CTLA4), CD154 (também conhecido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (também conhecido como PDL2), CD274 (também conhecido como PDL1), CD275 (também conhecido

como B7H2), CD276 (também conhecido como B7H3), CD278 (também conhecido como ICOS), CD279 (também conhecido como PD-1), CDH1 (também conhecido como E-caderina), quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (também conhecido como M-CSF), CSF-2 (também conhecido como GM-CSF), CSF-3 (também conhecido como GCSF), CX3CL1 (também conhecido como SCYD1), CXCL12 (também conhecido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GTR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (também conhecido como um receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (também conhecido como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (também conhecido como um receptor para IL33), STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (também conhecido como um correceptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1 (também conhecido como GPR5/CCXCR1). Em algumas modalidades, um ou mais dos alvos de antígeno acima são alvos de antígeno humanos.

[00229] Em qualquer uma das proteínas de ligação biespecíficas descritas acima, qualquer ligante ou combinação de ligantes descrito neste documento pode ser usado. Por exemplo, em algumas modalidades, pelo menos um de L₁, L₂, L₃ ou L₄ tem independentemente 0 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ ou L₄ têm, cada um independentemente, pelo menos um aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um

independentemente, têm zero aminoácido de comprimento ou compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ compreende a sequência TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ compreende a sequência S, e L₄ compreende a sequência RT. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ tem 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ compreende a sequência GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ têm 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ tem 0 aminoácidos de comprimento, L₃ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento.

Proteínas de ligação triespecíficas que se ligam a polipeptídeos CD38

[00230] Em algumas modalidades, a proteína de ligação da descrição é uma proteína de ligação triespecífica e/ou trivalente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam três sítios de ligação a antígeno que ligam um ou mais (por exemplo, três) alvos de antígeno ou proteínas alvo diferentes. Em algumas modalidades, pelo menos um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo

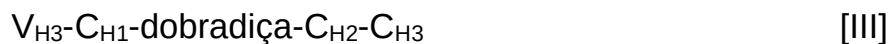
CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de polipeptídeo CD38 humano e/ou de macaco cinomolgos). Em algumas modalidades, uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada.

[00231] Em algumas modalidades, a proteína de ligação da descrição é uma proteína de ligação triespecífica e/ou trivalente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam três sítios de ligação a antígeno que ligam um ou mais (por exemplo, três) alvos de antígeno ou proteínas alvo diferentes. Em algumas modalidades, pelo menos um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de polipeptídeo CD38 humano e/ou de macaco cinomolgos). Em algumas modalidades, uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:

$V_{L3}-C_L$

[IV]

em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

e em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, a segunda e a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendem uma região Fc ligada a C_{H1} , as regiões Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} .

[00232] Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo têm uma orientação cruzada que forma dois sítios de ligação a antígeno distintos. Em algumas modalidades, o V_{H1} e V_{L1} formam um par de ligação e formam o primeiro sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o V_{H2} e

VL2 formam um par de ligação e formam o segundo sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o primeiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 (por exemplo, CD3 humano), e o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 (por exemplo, CD28 humano). Em algumas modalidades, o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 (por exemplo, CD3 humano), e o primeiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 (por exemplo, CD28 humano). Em algumas modalidades, o terceiro polipeptídeo e o quarto polipeptídeo formam um terceiro sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o VH3 e VL3 formam um par de ligação e formam o terceiro sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o terceiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, CD38 humano e opcionalmente de macaco cinomolgo). Formatos de proteína de ligação exemplificativos com orientações cruzadas contemplados para uso neste documento são também descritos em Pedido de Patente dos EUA N°. de Série 15/487.243 e Pedido Internacional N°. PCT/US2017/027488.

[00233] Em algumas modalidades em qualquer uma das proteínas de ligação biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas descritas neste documento, um sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, CD38 humano e opcionalmente de macaco cinomolgo). Em algumas modalidades, outros (por exemplo, não ligação a CD38) sítio(s) de ligação a antígeno de qualquer uma das proteínas de ligação biespecíficas, triespecíficas ou multiespecíficas descritas neste documento se ligam a CD28 ou CD3. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3

compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-

L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma

sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

[00234] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e/ou o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e/ou o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência

de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

[00235] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46). Em algumas modalidades, o domínio

V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

[00236] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3

compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2

compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

[00237] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY

(SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma

sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

[00238] Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a

sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

[00239] Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

[00240] Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e/ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio

V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

[00241] Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e/ou o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

[00242] Em algumas modalidades, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e/ou o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

[00243] Em algumas modalidades de qualquer uma das proteínas de ligação triespecíficas da presente invenção, um domínio de ligação a antígeno se liga a um polipeptídeo CD3 (por exemplo, CD3 humano) e um domínio de ligação a antígeno se liga a um polipeptídeo CD28 (por exemplo, CD28 humano). Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 49 ou 51 como mostrado na Tabela H, e o domínio V_{L1} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 50 ou 52 como mostrado na Tabela H. Em algumas modalidades, o

domínio V_{H2} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 49 ou 51 como mostrado na Tabela H, e o domínio V_{L2} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 50 ou 52 como mostrado na Tabela H. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 53 ou 84 como mostrado na Tabela H, e o domínio V_{L1} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 54 ou 85 como mostrado na Tabela H. Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 53 ou 84 como mostrado na Tabela H, e o domínio V_{L2} compreende três CDRs de SEQ ID NOs: 54 ou 85 como mostrado na Tabela H.

[00244] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54. Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54. Em algumas modalidades, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54.

[00245] Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

[00246] Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO:

64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 67, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 68, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95%

idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 70, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma sequência de polipeptídeo que é pelo menos 95% idêntica à sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

[00247] Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 67, e a quarta

cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 68, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 70, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69. Em determinadas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

[00248] Em qualquer uma das proteínas de ligação triespecíficas descritas acima, o antígeno alvo que não CD38 pode ser qualquer um dos seguintes alvos de antígeno exemplificativos: A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (também conhecido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (também conhecido como MCP-1), CCL3 (também conhecido como MIP-1a), CCL4 (também conhecido como MIP-1b), CCL5 (também conhecido como RANTES), CCL7 (também conhecido como MCP-3), CCL8 (também conhecido como mcp-2), CCL11 (também conhecido como eotaxina), CCL15 (também conhecido como

MIP-1d), CCL17 (também conhecido como TARC), CCL19 (também conhecido como MIP-3b), CCL20 (também conhecido como MIP-3a), CCL21 (também conhecido como MIP-2), CCL24 (também conhecido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (também conhecido como TECK), CCL26 (também conhecido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (também conhecido como FCER2, um receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (também conhecido como B7-1), CD86 (também conhecido como B7-2), CD122, CD137 (também conhecido como 41BB), CD137L, CD152 (também conhecido como CTLA4), CD154 (também conhecido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (também conhecido como PDL2), CD274 (também conhecido como PDL1), CD275 (também conhecido como B7H2), CD276 (também conhecido como B7H3), CD278 (também conhecido como ICOS), CD279 (também conhecido como PD-1), CDH1 (também conhecido como E-caderina), quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (também conhecido como M-CSF), CSF-2 (também conhecido como GM-CSF), CSF-3 (também conhecido como GCSF), CX3CL1 (também conhecido como SCYD1), CXCL12 (também conhecido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (também conhecido como um receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (também conhecido como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (também conhecido como um receptor para IL33), STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4,

TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (também conhecido como um correceptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1 (também conhecido como GPR5/CCXCR1). Em algumas modalidades, um ou mais dos alvos de antígeno acima são alvos de antígeno humanos.

[00249] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é um anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[00250] As proteínas de ligação da descrição podem ser preparadas usando domínios ou sequências obtidos ou derivados de qualquer anticorpo humano ou não humano, incluindo, por exemplo, anticorpos humanos, de murino ou humanizados.

Ligantes

[00251] Em algumas modalidades, os ligantes L₁, L₂, L₃ e L₄ variam de nenhum aminoácido (comprimento=0) a cerca de 100 aminoácidos de comprimento, ou menos de 100, 50, 40, 30, 20, ou 15 aminoácidos ou menos. Os ligantes podem também ter 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 aminoácidos de comprimento. L₁, L₂, L₃ e L₄ em uma proteína de ligação pode ter todos a mesma sequência de aminoácido ou pode ter todos diferentes sequências de aminoácidos.

[00252] Exemplos de ligantes adequados incluem um único resíduo de glicina (Gly); um peptídeo de diglicina (Gly-Gly); um tripeptídeo (Gly-Gly-Gly); um peptídeo com quatro resíduos de glicina; um peptídeo com cinco resíduos de glicina; um peptídeo com seis resíduos de glicina; um peptídeo com sete resíduos de glicina; e um peptídeo com oito resíduos de glicina. Outras combinações de resíduos de aminoácido podem ser usadas, tais como o peptídeo GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), o peptídeo GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), o peptídeo TKGPS (SEQ ID NO: 57), o peptídeo GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e o

peptídeo GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Os exemplos listados acima não pretendem limitar o escopo da descrição de qualquer forma, e ligantes compreendendo aminoácidos selecionados aleatoriamente selecionados do grupo que consiste em valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina e prolina mostraram se adequados nas proteínas de ligação. Para descrições adicionais de sequências de ligante, ver, por exemplo, WO2012135345 e Pedido Internacional Nº. PCT/US2017/027488.

[00253] A identidade e sequência de resíduos de aminoácido no ligante pode variar dependendo do tipo de elemento estrutural secundário necessário para alcançar no ligante. Por exemplo, glicina, serina e alanina são os melhores para ligantes com flexibilidade máxima. Algumas combinações de glicina, prolina, treonina e serina são úteis se for necessário um ligante mais rígido e estendido. Qualquer resíduo de aminoácido pode ser considerado um ligante em combinação com outros resíduos de aminoácido para construir ligantes de peptídeo maiores, como necessário dependendo das propriedades desejadas.

[00254] Em algumas modalidades, pelo menos um de L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 tem independentemente 0 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 têm, cada um independentemente, pelo menos um aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, o comprimento de L_1 é pelo menos duas vezes o comprimento de L_3 . Em algumas modalidades, o comprimento de L_2 é pelo menos duas vezes o comprimento de L_4 . Em algumas modalidades, o comprimento de L_1 é pelo menos duas vezes o comprimento de L_3 , e o comprimento de L_2 é pelo menos duas vezes o comprimento de L_4 . Em algumas modalidades, L_1 tem 3 a 12 resíduos de aminoácido de comprimento, L_2 tem 3 a 14 resíduos de aminoácido de comprimento, L_3 tem 1 a 8 resíduos de aminoácido de comprimento, e L_4 tem 1 a 3 resíduos de

aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 tem 5 a 10 resíduos de aminoácido de comprimento, L_2 tem 5 a 8 resíduos de aminoácido de comprimento, L_3 tem 1 a 5 resíduos de aminoácido de comprimento, e L_4 tem 1 a 2 resíduos de aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 tem 7 resíduos de aminoácido de comprimento, L_2 tem 5 resíduos de aminoácido de comprimento, L_3 tem 1 resíduo de aminoácido de comprimento, e L_4 tem 2 resíduos de aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 tem 10 resíduos de aminoácido de comprimento, L_2 tem 10 resíduos de aminoácido de comprimento, L_3 tem 0 resíduos de aminoácido de comprimento, e L_4 tem 0 resíduo de aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 , e L_4 têm, cada um, um comprimento independentemente selecionado de 0 a 15 aminoácidos (por exemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 aminoácidos), em que pelo menos dois dos ligantes têm um comprimento de 1 a 15 aminoácidos (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 aminoácidos). Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 , e L_4 têm, cada um, 0 aminoácidos de comprimento.

[00255] Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 , e/ou L_4 compreendem uma sequência derivada de uma sequência de ocorrência natural na junção entre um domínio variável de anticorpo e um domínio constante de anticorpo (por exemplo, como descrito no WO2012/135345). Por exemplo, em algumas modalidades, o ligante compreende uma sequência encontrada na transição entre um domínio V_H e C_{H1} endógeno, ou entre um domínio V_L e C_L endógeno (por exemplo, kapa ou lambda). Em algumas modalidades, o ligante compreende uma sequência encontrada na transição entre um domínio V_H e C_{H1} endógeno humano, ou entre um domínio V_L e C_L endógeno humano (por exemplo, humano kapa ou lambda).

[00256] Em algumas modalidades, L_1 , L_2 , L_3 e L_4 , cada um

independentemente, têm zero aminoácido de comprimento ou compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59).

[00257] Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ compreende a sequência TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ compreende a sequência S, e L₄ compreende a sequência RT. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ tem 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ compreende a sequência GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ tem 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ tem 0 aminoácidos de comprimento, L₃ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), e L₄ tem 0 aminoácidos de comprimento.

Domínios constantes e regiões Fc

[00258] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma cadeia pesada de anticorpo de comprimento total ou uma cadeia de polipeptídeo compreendendo uma região Fc. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc humana, por exemplo, uma região Fc de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4

humana. Em algumas modalidades, a região Fc inclui um anticorpo dobradiça, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, e opcionalmente C_{H4}. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana. Em algumas modalidades, a região Fc inclui uma ou mais das mutações descritas acima.

[00259] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção inclui uma ou duas variantes Fc. O termo "variante Fc" como usado neste documento refere-se a uma molécula ou sequência que é modificada de uma Fc nativa, mas ainda compreende um sítio de ligação para o receptor de salvamento, FcRn (receptor Fc neonatal). Exemplos de variantes Fc, e sua interação com o receptor de salvamento, são conhecidos na técnica. Dessa forma, o termo "variante Fc" pode compreender uma molécula ou sequência que é humanizada a partir de uma Fc nativa não humana. Além disso, uma Fc nativa compreende regiões que podem ser removidas porque proveem recursos estruturais ou atividade biológica que não são necessários para as proteínas de ligação do tipo anticorpo da invenção. Dessa forma, o termo "variante Fc" compreende uma molécula ou sequência que não possui um ou mais sítios ou resíduos nativos de Fc, ou em que um ou mais sítios ou resíduos de Fc devem ser modificados, que afetam ou estão envolvidos em: (1) formação de ligação dissulfeto, (2) incompatibilidade com uma célula hospedeira selecionada, (3) heterogeneidade de terminal N após expressão em uma célula hospedeira selecionada, (4) glicosilação, (5) interação com complemento, (6) ligação a um receptor Fc que não um receptor de salvamento, ou (7) citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC).

[00260] Em algumas modalidades, a região Fc compreende uma ou mais mutações que reduzem ou eliminam função efetora e/ou de ligação

a receptor Fc da região Fc (por exemplo, fagocitose celular dependente de anticorpo mediada por receptor Fc (ADCP), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)).

[00261] Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG1 humana compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e/ou 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são L234A, L235A e/ou P329A. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG1 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e/ou 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S298N, T299A e/ou Y300S.

[00262] Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma ou mais mutações que reduzem ou eliminam ligação de Fc γ I e/ou Fc γ II ligação. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma ou mais mutações que reduzem ou eliminam ligação de Fc γ I e/ou Fc γ II, mas não afetam ligação de FcRn. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e/ou 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S228P e/ou R409K. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e/ou 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são F234A e/ou L235A. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de

aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 234, 235, e/ou 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S228P, F234A, L235A e/ou R409K. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo mutações de aminoácido em substituições correspondentes às posições 228, 233-236, e/ou 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as mutações de aminoácido são S228P; E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236; e/ou R409K.

[00263] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para melhorar a purificação, por exemplo, modulando a afinidade para um reagente de purificação. Por exemplo, sabe-se que proteínas de ligação heterodiméricas podem ser seletivamente purificadas a partir de sua forma homodimérica se uma das duas regiões Fc da forma heterodimérica contém mutações que reduzem ou eliminam ligação à Proteína A, porque a forma heterodimérica terá uma afinidade intermediária purificação com base em Proteína A do que a forma homodimérica e pode ser seletivamente eluída da Proteína A, por exemplo, por uso de um pH diferente (Ver, por exemplo, Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943). Em algumas modalidades, a mutação compreende substituições em posições correspondentes às posições 435 e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são H435R e Y436F. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia

de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a C_{H1}, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a C_{H1}, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; e em que apenas uma das primeira e segunda regiões Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 435 e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são H435R e Y436F. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para melhorar a purificação. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00264] Para melhorar os rendimentos de algumas proteínas de ligação (por exemplo, proteínas de ligação biespecíficas ou triespecíficas), os domínios C_{H3} podem ser alterados pela tecnologia "*knob-into-holes*" que é descrita em detalhes com vários exemplos em, por exemplo, Publicação Internacional Nº. WO 96/027011, Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 617-21; e Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16: 677-81. Especificamente, as superfícies de interação dos dois domínios C_{H3} são alteradas para aumentar a heterodimerização de ambas as cadeias pesadas contendo esses dois domínios C_{H3}. Cada um dos dois domínios C_{H3} (das duas cadeias pesadas) pode ser o "*knob*", enquanto o outro é o "*hole*". A introdução de uma ponte dissulfeto ainda estabiliza os heterodímeros (Merchant *et al.*, 1998; Atwell *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.* 270: 26-35) e aumenta o rendimento. Em

modalidades particulares, o *knob* está no segundo par de polipeptídeos com um único domínio variável. Em outras modalidades, o *knob* está no primeiro par de polipeptídeos tendo a orientação cruzada. Ainda em outras modalidades, os domínios C_{H3} não incluem um *knob in hole*.

[00265] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção (por exemplo, uma proteína de ligação trispecífica) compreende uma mutação "*knob*" na segunda cadeia de polipeptídeo e uma mutação "*hole*" na terceira cadeia de polipeptídeo. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma mutação "*knob*" na terceira cadeia de polipeptídeo e uma mutação "*hole*" na segunda cadeia de polipeptídeo. Em algumas modalidades, a mutação "*knob*" compreende substituição(ões) em posições correspondentes às posições 354 e/ou 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S354C, T366W, T366Y, S354C e T366W ou S354C e T366Y. Em algumas modalidades, a mutação "*knob*" compreende substituições em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S354C e T366W. Em algumas modalidades, a mutação "*hole*" compreende substituição(ões) em posições correspondentes às posições 407 e, opcionalmente, 349, 366 e/ou 368 e de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são Y407V ou Y407T e opcionalmente Y349C, T366S e/ou L368A. Em algumas modalidades, a mutação "*hole*" compreende substituições em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V.

[00266] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo

ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às posições 366 e opcionalmente 354 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são T366W ou T366Y e opcionalmente S354C; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às posições 407 e opcionalmente 349, 366, e/ou 368 e de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y407V ou Y407T e opcionalmente Y349C, T366S e/ou L368A.

[00267] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às posições 407 e opcionalmente 349, 366, e/ou 368 e de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y407V ou Y407T e opcionalmente Y349C, T366S e/ou L368A; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às

posições 366 e opcionalmente 354 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são T366W ou T366Y e opcionalmente S354C.

[00268] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituição de aminoácido em posição correspondente à posição 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que a substituição de aminoácido é T366W; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às posições 366, 368, e/ou 407 e de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são T366S, L368A e/ou Y407V.

[00269] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituição(ões) de aminoácido em posições correspondentes às posições 366, 368, e/ou 407 e de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são T366S, L368A e/ou Y407V; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc

compreende substituição de aminoácido em posição correspondente à posição 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que a substituição de aminoácido é T366W.

[00270] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V. Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende

substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00271] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 354, 366, e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, S354C, T366W e R409K; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 349, 366, 368, 407 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V e R409K. Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 349, 366, 368, 407 e 409 de IgG4 humana de acordo

com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V e R409K; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 354, 366 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, S354C, T366W e R409K.

[00272] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, 354 e 366 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A, L235A, S354C e T366W; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, 349, 366, 368 e 407 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A e Y407V. Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região

de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} , em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, 349, 366, 368 e 407 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A e Y407V; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} , em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, 354, e 366 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A, L235A, S354C e T366W.

[00273] Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} , em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 234, 235, 354, 366 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, F234A, L235A, S354C, T366W e R409K; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} , em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407 e 409 de IgG4 humana de acordo

com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V e R409K. Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a CH1, em que a primeira região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V e R409K; e em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a CH1, em que a segunda região Fc é uma região Fc de IgG4 humana compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a segunda região Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228, 234, 235, 354, 366 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P, F234A, L235A, S354C, T366W e R409K.

[00274] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para melhorar a meia-vida sérica (ver, por exemplo, Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). Em algumas modalidades, a mutação compreende substituições em posições correspondentes às posições 428 e 434 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são M428L e N434S. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de

imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira e/ou segunda regiões Fc compreendem substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 428 e 434 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são M428L e N434S. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para melhorar a meia-vida sérica. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00275] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para melhorar a estabilidade, por exemplo, da interface de dímero e/ou região de dobradiça de IgG4 (ver, por exemplo, Spiess, C. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.* 288:26583-26593). Em algumas modalidades, a mutação compreende substituições em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a C_{H1}, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a C_{H1}, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; em

que a primeira e segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana; e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para melhorar a estabilidade. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00276] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para melhorar a purificação, por exemplo, modulando a afinidade para um reagente de purificação. Por exemplo, sabe-se que proteínas de ligação heterodiméricas podem ser seletivamente purificadas a partir de sua forma homodimérica se uma das duas regiões Fc da forma heterodimérica contém mutação(ões) que reduzem ou eliminam ligação à Proteína A, porque a forma heterodimérica terá uma afinidade intermediária purificação com base na Proteína A do que a forma homodimérica e pode ser seletivamente eluída da Proteína A, por exemplo, por uso de um pH diferente (ver, por exemplo, Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943). Em algumas modalidades, a mutação compreende substituições em posições correspondentes às posições 435 e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são H435R e Y436F. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a C_{H1}, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a C_{H1}, a segunda região

Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; e em que apenas uma das primeira e segunda regiões Fc compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 435 e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são H435R e Y436F. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para melhorar a purificação. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00277] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para melhorar a meia-vida sérica (ver, por exemplo, Hinton, P.R. et al. (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). Em algumas modalidades, a mutação compreende substituições em posições correspondentes às posições 428 e 434 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são M428L e N434S. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a CH1, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a CH1, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}, em que a primeira e/ou segunda regiões Fc compreendem substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 428 e 434 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as

substituições de aminoácido são M428L e N434S. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para melhorar a meia-vida sérica. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana.

[00278] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende uma ou mais mutações para reduzir a função efetora, por exemplo, fagocitose celular dependente de anticorpo mediada por receptor Fc (ADCP), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a C_{H1}, a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a C_{H1}, a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; em que a primeira e segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana; e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A e L235A. Em algumas modalidades, as regiões Fc da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são regiões Fc de IgG1 humana, e em que as regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A e

L235A. Em algumas modalidades, a segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma primeira região Fc ligada a C_{H1} , a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} ; em que a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreende uma segunda região Fc ligada a C_{H1} , a segunda região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} ; em que a primeira e segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana; e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A. Em algumas modalidades, as regiões Fc da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são regiões Fc de IgG1 humana, e em que as regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A. Em algumas modalidades, as regiões Fc da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são regiões Fc de IgG4 humana, e as regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A e L235A. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende uma segunda cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma primeira região Fc ligada a C_{H1} , a primeira região Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} , e uma terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendendo uma segunda região Fc ligada a C_{H1} , a segunda região Fc compreendendo

uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3}; e em que a primeira e a segunda regiões Fc compreendem, cada uma, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A e L235A.

[00279] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende mutações *knob* e *hole* e uma ou mais mutações para reduzir a função efetora. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana. Em algumas modalidades, a primeira e/ou segunda regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana. Para outras descrições de mutações Fc na posição 329, ver, por exemplo, Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 e WO1999051642.

[00280] Em algumas modalidades, os tipos de mutations descritas acima podem ser combinados em qualquer ordem ou combinação. Por exemplo, uma proteína de ligação da presente invenção pode compreender duas ou mais das mutações "knob" e "hole", as uma ou mais mutações para melhorar a meia-vida sérica, as uma ou mais mutações para melhorar a estabilidade de IgG4, as uma ou mais mutações para melhorar a purificação e/ou as uma ou mais mutações para reduzir a função efetora descrita acima.

[00281] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção compreende um fragmento de anticorpo, incluindo, mas sem limitação, fragmentos F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv ou scFv de anticorpo.

Ensaaios

[00282] A presente invenção provê proteínas de ligação a antígeno que ligam polipeptídeos CD38 humanos e/ou cinomolgos, induzem a proliferação de células T (por exemplo, célula T CD4+ e/ou CD8+), e/ou

induzem a apoptose de células CD38+. Ensaios exemplificativos para medir esses parâmetros e identificar tais proteínas de ligação são providos neste documento. Por exemplo, em algumas modalidades, a afinidade de ligação entre uma proteína de ligação ou fragmento de ligação a antígeno da mesma e um polipeptídeo CD38 purificado é medida por SPR (por exemplo, como descrito acima), e afinidade de ligação entre uma proteína de ligação ou fragmento de ligação a antígeno da mesma e um polipeptídeo CD38 expresso na superfície de uma célula é medida por citometria de fluxo (por exemplo, como descrito acima).

[00283] Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno de uma proteína de ligação da presente invenção liga o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0,8 nM ou menos, como medido por um ensaio de citometria de fluxo usando células que expressam o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 em sua superfície celular, por exemplo, como descrito acima. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0,75 nM ou menos, como medido por um ensaio de citometria de fluxo usando células que expressam o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 em sua superfície celular, por exemplo, como descrito acima. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, ou 0.83 nM ou menos, como medido por um ensaio SPR usando o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, por exemplo, como descrito acima. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 3,5 nM ou menos, 1,5 nM ou menos, ou 1,0 nM ou menos, como medido por um ensaio SPR usando o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30, por exemplo, como descrito acima. Como demonstrado neste documento, em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção pode ter uma ou mais das propriedades de ligação exemplificativas descritas neste documento. Em algumas modalidades, a K_D é medida a 4°C ou 25°C.

[00284] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação monoespecífica da presente invenção possui uma ou mais das seguintes características: liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada com uma K_D de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1,5 nM ou menos, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência

de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada com uma K_D de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, 1 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105)

expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; induz apoptose ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de uma célula expressando CD38 em sua superfície celular; e tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em ligação reduzida a Fc γ RI e/ou Fc γ RII, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, humano ou de macaco cinomolgo) expresso na superfície de uma célula com um EC₅₀ de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, humano ou de macaco cinomolgo) como uma proteína purificada com um EC₅₀ de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1 nM ou menos, como análise por ELISA. Em algumas modalidades, a K_D é medida a 4°C ou 25°C.

[00285] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação triespecífica da presente invenção possui uma ou mais das seguintes características: induz proliferação de células T (por exemplo, célula T CD4⁺ e/ou CD8⁺); induz expressão de células T (por exemplo, célula T CD4⁺ e/ou CD8⁺) de Bcl-xL; induz apoptose de células CD38⁺ (por exemplo, como medido por mancha com Anexina V e/ou absorção de iodeto de propídio); liga-se a CD38 expresso na superfície de uma célula e um ou mais antígeno(s) alvo de célula T expresso(s) na superfície de uma célula T; liga-se a CD38 expresso na superfície de uma célula, CD28 expresso na superfície de uma célula T, e CD3 expresso na superfície de uma célula T; estimula ativação do receptor de célula T (por exemplo, como medido por expressão de CD69); induz coestimulação de sinalização de receptor de célula T (por exemplo,

como mediado por CD28); tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em indução reduzida de liberação de citocina (por exemplo, IFN- γ , IL-2 e/ou TNF- α) por PBMCs, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações; induz liberação de citocina (por exemplo, IFN- γ e/ou IL-6) por PBMCs na presença de uma célula alvo CD38⁺ (por exemplo, como medido por imunoensaio); liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) como uma proteína purificada com uma K_D de 1,5 nM ou menos, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 12 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) como uma proteína purificada com uma K_D de 3,5 nM ou menos, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria

de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30) expresso na superfície de uma célula com uma K_D aparente de 7,5 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) como uma proteína purificada, como análise por SPR ou ELISA; liga-se ao domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105) expresso na superfície de uma célula, como análise por citometria de fluxo; induz apoptose ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de uma célula expressando CD38 em sua superfície celular; e tem uma ou mais mutações (por exemplo, em uma região Fc) resultando em ligação reduzida a Fc γ RI e/ou Fc γ RII, em comparação com a mesma proteína de ligação sem as uma ou mais mutações. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, humano ou de macaco cinomolgo) expresso na superfície de uma célula com um EC50 de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1 nM ou menos, como análise por citometria de fluxo. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, humano ou de macaco cinomolgo) como uma proteína purificada com um EC50 de 20 nM ou menos, 15 nM ou menos, 12 nM ou menos, 10 nM ou menos, 5 nM ou menos, 2 nM ou menos, ou 1 nM ou menos, como análise por ELISA.

Ácidos nucleicos

[00286] Metodologias de DNA recombinante padrão são usadas para construir os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos que

formam as proteínas de ligação, incorporam esses polinucleotídeos em vetores de expressão recombinantes, e introduzem tais vetores em células hospedeiras. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). Reações enzimáticas e técnicas de purificação podem ser realizadas de acordo com especificações do fabricante, como comumente realizado na técnica, ou como descrito neste documento. A menos que definições específicas sejam providas, a nomenclatura usada em conexão com, e os procedimentos e técnicas laboratoriais de, química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica descritas neste documento são aquelas conhecidas e comumente usadas na técnica. Da mesma forma, técnicas convencionais podem ser usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, entrega e tratamento de pacientes.

[00287] Outros aspectos da presente invenção referem-se a moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo uma sequência de nucleotídeo codificando qualquer uma das proteínas de ligação descritas neste documento. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico isoladas compreendem uma sequência que é pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% idêntica às SEQ ID NOs: 60-83 e/ou mostradas na Tabela J.

[00288] Determinados aspectos da presente invenção referem-se a kits de polinucleotídeos. Em algumas modalidades, um ou mais dos polinucleotídeos é um vetor (por exemplo, um vetor de expressão). Os kits podem encontrar uso, entre outros, na produção de uma ou mais das proteínas de ligação descritas neste documento, por exemplo, uma

proteína de ligação trispecífica da presente invenção. Em algumas modalidades, o kit compreende um, dois, três ou quatro polinucleotídeos mostrados na Tabela J (por exemplo, de mAb2xCD28supxCD3mid IgG4 FALA, mAb2xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A, mAb2xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA, mAb6xCD28supxCD3mid IgG4 FALA, mAb6xCD28supxCD3mid IgG1LALA P329A, ou mAb6xCD28supxCD3mid IgG1 NNSA). Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 74, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75. Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 77, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75. Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 79, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75. Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 80, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81. Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos

compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 82, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81. Em algumas modalidades, um kit de polinucleotídeos compreende: um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 83, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81.

[00289] Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado é operativamente ligado a um promotor heterólogo para direcionar a transcrição da sequência de ácido nucleico codificando proteína de ligação. Um promotor pode se referir a sequências de controle de ácido nucleico que direcionam a transcrição de um ácido nucleico. Uma primeira sequência de ácido nucleico é operativamente ligada a uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico é colocada em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor é operativamente ligado a uma sequência de codificação de uma proteína de ligação se o promotor afeta a transcrição ou expressão da sequência de codificação. Exemplos de promotores podem incluir, mas sem limitação, promotores obtidos a partir de genomas de vírus (tais como vírus do políoma, vírus da varíola), adenovírus (tais como o adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, retrovírus, vírus da hepatite B, vírus de símio 40 (SV40) e similares), de promotores eucarióticos heterólogos (tais como o promotor de actina, um promotor de imunoglobulina, de promotores de choque térmico etc.), o promotor de CAG (Niwa et al., Gene 108(2):193-9, 1991), o promotor

de fosfoglicerato quinase (PGK), um promotor induzível por tetraciclina (Masui et al., Nucleic Acid Res. 33:e43, 2005), o sistema lac, o sistema trp, o sistema tac, o sistema trc, as principais regiões operadoras e promotoras de fago lambda, o promotor para 3-fosfoglicerato quinase, os promotores de fosfatase ácida da levedura, e o promotor dos fatores de alfa-correspondência de levedura. Os polinucleotídeos que codificam proteínas de ligação da presente invenção podem estar sob o controle de um promotor constitutivo, um promotor induzível ou qualquer outro promotor adequado descrito neste documento ou outro promotor adequado que será prontamente reconhecido por um versado na técnica.

[00290] Em algumas estatísticas, o ácido nucleico isolado é incorporado em um vetor. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de expressão. Vetores de expressão podem incluir uma ou mais sequências reguladoras operacionalmente ligadas ao polinucleotídeo a ser expresso. O termo "sequência reguladora" inclui promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Exemplos de intensificadores adequados podem incluir, mas sem limitação, sequências intensificadoras de genes de mamífero (tais como globina, elastase, albumina, α -fetoproteína, insulina e similares), e sequências intensificadoras de um vírus de célula eucariótica (tal como intensificador SV40 no lado tardio da origem da replicação (pb 100-270), o intensificador de promotor precoce de citomegalovírus, o intensificador de polioma no lado tardio da origem de replicação, intensificadores de adenovírus e semelhantes). Exemplos de vetores adequados podem incluir, por exemplo, plasmídeos, cosmídeos, episômas, transposons e vetores virais (por exemplo, adenovirais, vírus vaccinia, vírus Sínbis, sarampo, herpes viral, lentivirais, retrovirais, vetores virais adeno-associados etc.). Vetores de expressão

podem ser usados para transfectar células hospedeiras, tais como, por exemplo, células bacterianas, células de leveduras, células de insetos e células de mamíferos. Vetores de DNA virais e de plasmídeo biologicamente funcionais capazes de expressão e replicação em um hospedeiro são conhecidos na técnica, e podem ser usados para transfectar qualquer célula de interesse.

[00291] Outros aspectos da presente invenção referem-se a um sistema de vetor compreendendo um ou mais vetores codificando uma primeira, segunda, terceira e quarta cadeias de polipeptídeo de qualquer uma das proteínas de ligação descritas neste documento. Em algumas modalidades, o sistema de vetor compreende um primeiro vetor codificando a primeira cadeia de polipeptídeo da proteína de ligação, um segundo vetor codificando a segunda cadeia de polipeptídeo da proteína de ligação, um terceiro vetor codificando a terceira cadeia de polipeptídeo da proteína de ligação, e um quarto vetor codificando a quarta cadeia de polipeptídeo da proteína de ligação. Em algumas modalidades, o sistema de vetor compreende um primeiro vetor codificando as primeira e segunda cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação, e um segundo vetor codificando as terceira e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação. Em algumas modalidades, o sistema de vetor compreende um primeiro vetor codificando as primeira e terceira cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação, e um segundo vetor codificando as segunda e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação. Em algumas modalidades, o sistema de vetor compreende um primeiro vetor codificando as primeira e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação, e um segundo vetor codificando a segunda e terceira cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação. Em algumas modalidades, o sistema de vetor compreende um primeiro vetor codificando as primeira, segunda, terceira e quarta cadeias de polipeptídeo da proteína de ligação. Os um ou mais vetores do sistema

de vetor podem ser qualquer um dos vetores descritos neste documento. Em algumas modalidades, os um ou mais vetores são vetores de expressão.

Células Hospedeiras Isoladas

[00292] Outros aspectos da presente invenção referem-se a uma célula hospedeira isolada compreendendo um ou mais polinucleotídeos isolados, kits de polinucleotídeo, vetores e/ou sistemas de vetor descritos neste documento. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula bacteriana (por exemplo, uma célula de *E. coli*). Em algumas categorias, a célula hospedeira é uma célula de levedura (por exemplo, uma célula de *S. cerevisiae*). Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de inseto. Exemplos de células hospedeiras de insetos podem incluir, por exemplo, células de *Drosophila* (por exemplo, células S2), células de *Trichoplusia ni* (por exemplo, células High Five™) e células de *Spodoptera frugiperda* (por exemplo, células Sf21 ou Sf9). Em algumas modalidades, a célula hospedeira é uma célula de mamífero. Exemplos de células hospedeiras de mamíferos podem incluir, por exemplo, células renais embrionárias humanas (por exemplo, 293 ou 293 células subclonadas para crescimento em cultura em suspensão), células Expi293™, células CHO, células renais de hamster bebê (por exemplo, BHK, ATCC CCL 10), células de sertoli de camundongo (por exemplo, células TM4), células renais de macaco (por exemplo, CV1 ATCC CCL 70), células renais de macaco verde africano (por exemplo, VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (por exemplo, HELA, ATCC CCL 2), células de rim canino (por exemplo, MDCK, ATCC CCL 34), células de fígado de rato - búfalo (por exemplo, BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmão humano (por exemplo, W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (por exemplo, Hep G2, HB 8065), células tumorais mamárias de ratos (por exemplo, MMT 060562, ATCC CCL51),

células TRI, células MRC 5, células FS4, uma linhagem de hepatoma humano (por exemplo, Hep G2) e células de mieloma (por exemplo, células NS0 e Sp2/0).

[00293] Outros aspectos da presente invenção referem-se a um método de produção de qualquer uma das proteínas de ligação descritas neste documento. Em algumas modalidades, o método inclui a) cultivar uma célula hospedada (por exemplo, qualquer uma das células hospedeiras descritas neste documento) compreendendo um ácido nucleico isolado, vetor e/ou sistema de vetor (por exemplo, qualquer um dos ácidos nucleicos isolados, vetores e/ou sistemas de vetores descritos neste documento) em condições em que a célula hospedeira expressa a proteína de ligação; e b) isolar a proteína de ligação da célula hospedeira. Métodos de cultivar células hospedeiras sob condições para expressar uma proteína são bem conhecidos por um versado na técnica. Métodos de isolamento de proteínas de células hospedeiras cultivadas são bem conhecidos dos versados na técnica, incluindo, por exemplo, por cromatografia de afinidade (por exemplo, cromatografia de afinidade em duas etapas compreendendo cromatografia de afinidade com Proteína A seguida por cromatografia por exclusão de tamanho).

[00294] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é purificada por cromatografia de afinidade com Proteína A, cromatografia de afinidade de cadeia leve kapa (por exemplo, usando uma resina KapaSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare), e opcionalmente cromatografia de afinidade de cadeia leve lambda (por exemplo, usando uma resina LambdaFabSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é purificada por cromatografia de afinidade com Proteína A, cromatografia de afinidade de cadeia leve lambda (por

exemplo, usando uma resina LambdaFabSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare), e opcionalmente cromatografia de afinidade de cadeia leve kapa (por exemplo, usando uma resina KapaSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare). Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende duas regiões Fc, cada um compreendendo um domínio C_{H3}, e apenas um dos domínios C_{H3} compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 435 e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são H435R e Y436F. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é purificada por cromatografia de afinidade com Proteína A, em seguida, cromatografia de afinidade de cadeia leve kapa (por exemplo, usando uma resina KapaSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare), em seguida, opcionalmente cromatografia de afinidade de cadeia leve lambda (por exemplo, usando uma resina LambdaFabSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare) em sequência. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é purificada por cromatografia de afinidade com Proteína A, em seguida, cromatografia de afinidade de cadeia leve lambda (por exemplo, usando uma resina LambdaFabSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare), em seguida, opcionalmente cromatografia de afinidade de cadeia leve kapa (por exemplo, usando uma resina KapaSelect de acordo com instruções do fabricante; GE Healthcare) em sequência. Por exemplo, em algumas modalidades, a proteína de ligação é contactada com Proteína A, eluída da Proteína A sob condições adequadas para isolar a proteína de ligação de proteínas de ligação compreendendo 0 ou 2 domínios C_{H3} compreendendo as substituições de aminoácido H435R e Y436F, contactada com um meio de afinidade de cadeia leve

kapa (por exemplo, como usado na resina KapaSelect; GE Healthcare), e eluída do meio de afinidade de cadeia leve kapa sob condições adequadas para isolar a proteína de ligação de proteínas de ligação compreendendo apenas domínios lambda C_L (por exemplo, de acordo com instruções do fabricante). Condições adequadas para a eluição de Proteína A são conhecidos na técnica, incluindo sem limitação, um gradiente de eluição em etapas de pH 4,5-2,8. Em algumas modalidades, Proteína A ou uma variante de Proteína A útil para purificação de proteína é usada. Em algumas modalidades, a Proteína A é anexada a um substrato ou resina, por exemplo, como parte de um meio de cromatografia. Em algumas modalidades, após eluição do meio de afinidade de cadeia leve kapa, a proteína de ligação é contactada com um meio de afinidade de cadeia leve lambda (por exemplo, como usado na resina LambdaFabSelect; GE Healthcare), e eluída do meio de afinidade de cadeia leve lambda sob condições adequadas para isolar a proteína de ligação de proteínas de ligação compreendendo apenas domínios kapa C_L (por exemplo, de acordo com instruções do fabricante). Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é detectada usando cromatografia HIC. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende: uma primeira cadeia de polipeptídeo que compreende um domínio lambda C_L; um domínio C_{H3} de uma segunda cadeia de polipeptídeo que compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W; um domínio C_{H3} de uma terceira cadeia de polipeptídeo que compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368, 407, 435, e 436 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A, Y407V, H435R e Y436F; e uma quarta cadeia de polipeptídeo que

compreende um domínio kapa C_L. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é produzida por uma célula hospedeira. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é purificada de um meio de cultura celular ou extrato de célula hospedeira. Em algumas modalidades, as proteínas de ligação são secretadas por uma célula hospedeira ou produzidas e extraídas de uma célula hospedeira (por exemplo, antes de serem contactadas com a Proteína A). Em algumas modalidades, a proteína de ligação está em um meio de cultura celular ou extrato de célula hospedeira quando contactada com a Proteína A. Em algumas modalidades, a proteína de ligação é purificada a partir de outras proteínas de ligação, polipeptídeos, e/ou outros componentes celulares.

III. Proteínas de Ligação Triespecíficas

[00295] Em algumas modalidades, a proteína de ligação da descrição é uma proteína de ligação triespecífica e/ou trivalente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam três sítios de ligação a antígeno que ligam um ou mais (por exemplo, três) alvos de antígeno ou proteínas alvo diferentes. Em algumas modalidades, uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, a primeira cadeia de polipeptídeo e a segunda cadeia de polipeptídeo têm uma orientação cruzada que forma dois sítios de ligação a antígeno distintos. Como descrito acima, a segunda e terceira cadeias de polipeptídeo incluem uma região Fc (por exemplo, compreendendo os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3}). Em algumas

modalidades, uma ou ambas as regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, as regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana compreendendo mutações de aminoácido em substituições correspondentes às posições 228, 233-236 e/ou 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as mutações de aminoácido são S228P; E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236; e/ou R409K. Em algumas modalidades, uma ou ambas as regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, e/ou 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são L234A, L235A, e/ou P329A. Em algumas modalidades, as regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299, e/ou 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S298N, T299A, e/ou Y300S.

[00296] Em algumas modalidades, a proteína de ligação da descrição é uma proteína de ligação triespecífica e/ou trivalente compreendendo quatro cadeias de polipeptídeo que formam três sítios de ligação a antígeno que ligam um ou mais (por exemplo, três) alvos de antígeno ou proteínas alvo diferentes. Em algumas modalidades, pelo menos um dos sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 (por exemplo, o domínio extracelular de polipeptídeo CD38 humano e/ou de macaco cinomolgos). Em algumas modalidades, uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura

representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

e em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada. Em algumas modalidades, a segunda e a terceira cadeia de polipeptídeo ainda compreendem uma região Fc ligada a C_{H1} , as regiões Fc compreendendo uma região de dobradiça de imunoglobulina e domínios constantes de cadeia pesada de imunoglobulina C_{H2} e C_{H3} . Em algumas modalidades, uma ou ambas as regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236. Em algumas modalidades, as regiões Fc são regiões Fc de IgG4 humana compreendendo mutações de aminoácido em substituições correspondentes às posições 228, 233-236, e/ou 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as mutações de aminoácido são S228P; E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236; e/ou R409K. Em algumas modalidades, uma ou ambas as regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana compreendendo uma ou mais substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235, e/ou 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são L234A, L235A, e/ou P329A. Em algumas modalidades, as regiões Fc são regiões Fc de IgG1 humana compreendendo substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299, e/ou 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE. Em algumas modalidades, as substituições de aminoácido são S298N, T299A, e/ou Y300S.

[00297] Em algumas modalidades, o VH1 e VL1 formam um par de ligação e formam um primeiro sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o VH2 e VL2 formam um par de ligação e formam um

segundo sítio de ligação a antígeno. Em algumas modalidades, o VH3 e VL3 formam um par de ligação e formam um terceiro sítio de ligação a antígeno. As proteínas de ligação podem também ser usadas para ativação celular, direcionamento tumoral, neutralização de atividades de citocina, neutralização de infecção viral, combinação de múltiplos eventos de sinalização, para tratar câncer, artrite e/ou distúrbios inflamatórios. Por exemplo, em algumas modalidades, uma proteína de ligação especificamente liga um, dois ou três alvos de antígeno selecionados de A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (também conhecido como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (também conhecido como MCP-1), CCL3 (também conhecido como MIP-1a), CCL4 (também conhecido como MIP-1b), CCL5 (também conhecido como RANTES), CCL7 (também conhecido como MCP-3), CCL8 (também conhecido como mcp-2), CCL11 (também conhecido como eotaxina), CCL15 (também conhecido como MIP-1d), CCL17 (também conhecido como TARC), CCL19 (também conhecido como MIP-3b), CCL20 (também conhecido como MIP-3a), CCL21 (também conhecido como MIP-2), CCL24 (também conhecido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (também conhecido como TECK), CCL26 (também conhecido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (também conhecido como FCER2, um receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (também conhecido como B7-1), CD86 (também conhecido como B7-2), CD122, CD137 (também conhecido como 41BB), CD137L, CD152 (também conhecido como CTLA4), CD154 (também conhecido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (também conhecido como PDL2), CD274 (também conhecido como PDL1), CD275 (também conhecido como B7H2), CD276 (também conhecido como B7H3), CD278 (também conhecido como ICOS), CD279 (também conhecido como PD-1), CDH1 (também conhecido

como E-caderina), quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (também conhecido como M-CSF), CSF-2 (também conhecido como GM-CSF), CSF-3 (também conhecido como GCSF), CX3CL1 (também conhecido como SCYD1), CXCL12 (também conhecido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (também conhecido como um receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (também conhecido como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (também conhecido como um receptor para IL33), STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (também conhecido como um correceptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1 (também conhecido como GPR5/CCXCR1). Em algumas modalidades, um ou mais dos alvos de antígeno acima são alvos de antígeno humanos.

[00298] Em algumas modalidades, um dos três sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 (por exemplo, um polipeptídeo CD3 humano), um dos três sítios de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 (por exemplo, um polipeptídeo CD28 humano), e um dos três sítios de ligação a antígeno liga um terceiro polipeptídeo. Em algumas modalidades, o sítio de ligação a antígeno que especificamente liga um alvo de antígeno que não CD3 ou CD28 liga um alvo de antígeno selecionado de A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (também conhecido como VTCN1),

B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (também conhecido como MCP-1), CCL3 (também conhecido como MIP-1a), CCL4 (também conhecido como MIP-1b), CCL5 (também conhecido como RANTES), CCL7 (também conhecido como MCP-3), CCL8 (também conhecido como mcp-2), CCL11 (também conhecido como eotaxina), CCL15 (também conhecido como MIP-1d), CCL17 (também conhecido como TARC), CCL19 (também conhecido como MIP-3b), CCL20 (também conhecido como MIP-3a), CCL21 (também conhecido como MIP-2), CCL24 (também conhecido como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (também conhecido como TECK), CCL26 (também conhecido como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD19, CD20, CD23 (também conhecido como FCER2, um receptor para IgE), CD24, CD27, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (também conhecido como B7-1), CD86 (também conhecido como B7-2), CD122, CD137 (também conhecido como 41BB), CD137L, CD152 (também conhecido como CTLA4), CD154 (também conhecido como CD40L), CD160, CD272, CD273 (também conhecido como PDL2), CD274 (também conhecido como PDL1), CD275 (também conhecido como B7H2), CD276 (também conhecido como B7H3), CD278 (também conhecido como ICOS), CD279 (também conhecido como PD-1), CDH1 (também conhecido como E-caderina), quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (também conhecido como M-CSF), CSF-2 (também conhecido como GM-CSF), CSF-3 (também conhecido como GCSF), CX3CL1 (também conhecido como SCYD1), CXCL12 (também conhecido como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG, IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb (também conhecido como um receptor para IL25), IL18, IL22,

IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (também conhecido como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2 (também conhecido como um receptor para IL33), STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (também conhecido como um correceptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM, e XCR1 (também conhecido como GPR5/CCXCR1). Em algumas modalidades, um ou mais dos alvos de antígeno acima são alvos de antígeno humanos.

[00299] Em qualquer uma das proteínas de ligação triespecíficas descritas acima, qualquer ligante ou combinação de ligantes descrito neste documento pode ser usado. Por exemplo, em algumas modalidades, pelo menos um de L₁, L₂, L₃ ou L₄ tem independentemente 0 aminoácidos de comprimento. Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ ou L₄ têm, cada um independentemente, pelo menos um aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, têm zero aminoácido de comprimento ou compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ compreende a sequência TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ compreende a sequência S, e L₄ compreende a

sequência RT. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ tem 0 aminoácido de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ tem 0 aminoácido de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento. Em algumas modalidades, L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ tem 0 aminoácido de comprimento, L₃ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento.

IV. Usos para Proteínas de Ligação

[00300] As proteínas de ligação podem ser usadas em qualquer método de ensaio conhecido, tais como ensaios de ligação competitiva, ensaios sanduíche diretos e indiretos, e ensaios de imunoprecipitação para a detecção e quantificação de um ou mais antígenos alvo. As proteínas de ligação irão ligar os um ou mais antígenos alvo com uma afinidade que é apropriada para o método de ensaio que está sendo usado.

[00301] Para aplicações de diagnóstico, em determinadas modalidades, as proteínas de ligação podem ser rotuladas com uma porção detectável. A porção detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, direta ou indiretamente, um sinal detectável. Por exemplo, a porção detectável pode ser um radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ¹²⁵I, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In ou ⁶⁷Ga; um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, β-galactosidase, ou peroxidase de rábano silvestre.

[00302] As proteínas de ligação também são úteis para imagens *in vivo*. Uma proteína de ligação rotulada com uma porção detectável pode

ser administrada a um animal, de preferência na corrente sanguínea, e a presença e localização do anticorpo rotulado no hospedeiro podem ser analisadas. A proteína de ligação pode ser rotulada com qualquer porção que seja detectável em um animal, seja por ressonância magnética nuclear, radiologia ou outro meio de detecção conhecido na técnica.

[00303] Para aplicações clínicas ou de pesquisa, em determinadas modalidades, as proteínas de ligação podem ser conjugadas a um agente citotóxico. Uma variedade de anticorpos acoplados a agentes citotóxicos (isto é, conjugados anticorpo-droga) têm sido usada para direcionar cargas úteis citotóxicas a células tumorais específicas. Agentes citotóxicos e ligantes que conjugam os agentes a um anticorpo são conhecidos na técnica; ver, por exemplo, Parslow, A.C. et al. (2016) *Biomedicines* 4:14 e Kalim, M. et al. (2017) *Drug Des. Devel. Ther.* 11: 2265-2276.

[00304] A descrição também se refere a um kit que compreende uma proteína de ligação e outros reagentes úteis para detectar níveis de antígeno alvo em amostras biológicas. Esses reagentes podem incluir um rótulo detectável, soro de bloqueio, amostras de controle positivo e negativo e reagentes de detecção. Em algumas modalidades, o kit compreende uma composição compreendendo qualquer proteína de ligação, polinucleotídeo, vetor, sistema de vetor e/ou célula hospedeira descrita neste documento. Em algumas modalidades, o kit compreende um recipiente e um rótulo ou bula associado ao recipiente. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, bolsas de solução IV etc. Os recipientes podem ser constituídos por uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente contém uma composição que é por si só combinada com outra composição eficaz para tratar, prevenir e/ou diagnosticar uma condição e pode ter uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser uma

bolsa de solução intravenosa ou um frasco tendo uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Em algumas modalidades, o rótulo ou bula indica que a composição é usada para prevenir, diagnosticar e/ou tratar a condição de escolha. Alternativamente ou adicionalmente, o artigo de fabricação ou kit ainda pode compreender um segundo (ou terceiro) recipiente compreendendo um tampão farmacêuticamente aceitável, tal como água bacteriostática para injeção (BWFI), solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode ainda incluir outros materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas e seringas.

[00305] Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é administrada a um paciente em necessidade da mesma para o tratamento ou prevenção de câncer. Em algumas modalidades, a presente invenção presente invenção refere-se a um método de prevenir e/ou tratar um distúrbio ou doença proliferativa (por exemplo, *câncer*). Em algumas modalidades, o método compreende administrar a um paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma das proteínas de ligação, ou composições farmacêuticas relacionadas às mesmas, descritas neste documento. Em algumas modalidades, a presente invenção presente invenção refere-se ao uso de pelo menos uma das proteínas de ligação, ou composições farmacêuticas relacionadas às mesmas, descritas neste documento para prevenir e/ou tratar um distúrbio ou doença proliferativa (por exemplo, *câncer*) em um paciente em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a presente invenção presente invenção refere-se a pelo menos uma das proteínas de ligação, ou composições farmacêuticas relacionadas às mesmas, descritas neste documento para uso na fabricação de um medicamento para prevenir e/ou tratar um distúrbio ou doença proliferativa (por exemplo, *câncer*) em um paciente

em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que liga uma proteína de superfície de célula T e outro sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, por exemplo, como descrito no section II acima. Em algumas modalidades, a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD28 humano, e um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD3 humano.

[00306] Em algumas modalidades, as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma A de CD38 humano em sua superfície celular (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1). Em algumas modalidades, as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano em sua superfície celular (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105). Em algumas modalidades, o paciente é selecionado para tratamento com base em que as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano em sua superfície celular (por exemplo, compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105). Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e CD28. Em algumas modalidades, as células de câncer expressam CD38 e não expressam CD28.

[00307] Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, linfoma, câncer mama, tal como câncer de mama Her2+, câncer de próstata, linfoma de células B de centro germinal ou leucemia linfoblástica aguda de células B. Em determinadas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo. Em determinadas modalidades, o câncer é leucemia mieloide aguda (AML), leucemia

linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), ou um linfoma de células B.

[00308] Em determinadas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo. Anticorpos anti-CD38 foram testados para o tratamento de mieloma múltiplo, tais como daratumumab e isatuximabe. No entanto, embora o mieloma múltiplo seja considerado tratável, a recidiva é inevitável em quase todos os pacientes, levando ao desenvolvimento de doença refratária ao tratamento. Em algumas modalidades, o câncer é mieloma múltiplo recorrente ou refratário. Em algumas modalidades, o paciente foi tratado com um tratamento prévio para mieloma múltiplo. Em algumas modalidades, uma proteína de ligação da presente invenção é administrada ao paciente como tratamento de 1ª, 2ª ou 3ª linha para mieloma múltiplo. Sem desejar estar vinculado à teoria, acredita-se que uma proteína de ligação anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 da presente invenção possa ser útil no tratamento de mieloma múltiplo, por exemplo, recrutando células T para células tumorais através de anti-CD38 (ou anti-CD28/anti-CD38), ativação de células envolvidas através de anti-CD3/anti-CD28, e/ou extermínio de células tumorais através de mecanismos baseados em perforina/granzima. O CD28 foi relatado como um novo marcador de câncer para mieloma múltiplo. Ver Nair, J.R. *et al.* (2011) *J. Immunol.* 187:1243-1253.

[00309] Em algumas modalidades, a pelo menos uma proteína de ligação é administrada (ou deve ser administrada) em combinação com uma ou mais terapias anticâncer (por exemplo, qualquer terapia anticâncer conhecida na técnica, tal como uma terapia ou agente quimioterápico). Em algumas modalidades, a pelo menos uma proteína de ligação é administrada (ou deve ser administrada) antes das uma ou mais terapias anticâncer. Em algumas modalidades, a pelo menos uma proteína de ligação é administrada (ou deve ser administrada) simultaneamente com as uma ou mais terapias anticâncer. Em algumas

modalidades, a pelo menos uma proteína de ligação é administrada (ou deve ser administrada) após as uma ou mais terapias antirretrovirais.

V. Composições Terapêuticas de Proteína de Ligação e Administração das Mesmas

[00310] As composições terapêuticas ou farmacêuticas compreendendo proteínas de ligação estão dentro do escopo da descrição. Essas composições terapêuticas ou farmacêuticas podem compreender uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína de ligação, ou conjugado de proteína de ligação-droga, em mistura com um agente de formulação farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitável selecionado para adequação ao modo de administração.

[00311] Os materiais de formulação aceitáveis são preferencialmente não-tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações usadas.

[00312] A composição farmacêutica pode conter materiais de formulação para modificar, manter ou conservar, por exemplo, o pH, osmolaridade, viscosidade, clareza, cor, isotonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração da composição. Materiais de formulação adequados incluem, mas sem limitação, aminoácidos (tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tais como ácido ascórbico, sulfito de sódio ou hidrogenossulfito de sódio), tampões (tais como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos ou outros ácidos orgânicos), agentes de volume (tais como manitol ou glicina), agentes quelantes (tais como ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA)), agentes complexantes (tais como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina ou hidroxipropil-beta-ciclodextrina), excipientes, monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos (tais como glicose, manose ou dextrinas), proteínas (tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas), agentes corantes, aromatizantes e diluentes, agentes emulsificantes, polímeros hidrofílicos (tais como

polivinilpirrolidona), polipeptídeos de baixo peso molecular, contraíons formadores de sal (tais como sódio), conservantes (tais como cloreto de benzalcônio, ácido benzóico, ácido salicílico, timerosal, álcool fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorexidina, ácido sórbico ou peróxido de hidrogênio), solventes (tais como glicerina, propileno glicol ou polietileno glicol), álcoois de açúcar (tais como manitol ou sorbitol), agentes de suspensão, agentes umectantes ou tensoativos (tais como pluronics; PEG; ésteres de sorbitano; polissorbatos, tais como polissorbato 20 ou polissorbato 80; triton; trometamina; lecitina; colesterol ou tiloxapal), agentes de aumento de estabilidade (tais como sacarose ou sorbitol), agentes de aumento de tonicidade (tais como halogenetos de metais alcalinos - de preferência cloreto de sódio ou potássio - ou manitol sorbitol), veículos de entrega, diluentes, excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos (ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a Ed., AR Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), e edições subsequentes, incorporados neste documento por referência para qualquer finalidade).

[00313] A composição farmacêutica ideal será determinada por um versado na técnica, dependendo, por exemplo, da via de administração pretendida, formato de entrega e dosagem desejada. Tais composições podem influenciar o estado físico, a estabilidade, a taxa de liberação *in vivo* e a taxa de depuração da proteína de ligação *in vivo*.

[00314] O veículo ou portador primário em uma composição farmacêutica pode ser aquoso ou não aquoso na natureza. Por exemplo, um veículo ou portador adequado para injeção pode ser água, solução salina fisiológica ou líquido cefalorraquidiano artificial, possivelmente suplementado com outros materiais comuns em composições para administração parenteral. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina sérica são ainda veículos exemplificativos. Outras composições farmacêuticas

exemplificativas compreendem tampão Tris de cerca de pH 7,0-8,5 ou o tampão de acetato de cerca de pH de 4,0-5,5, que ainda podem as quais ainda podem incluir sorbitol ou um substituto adequado. Em uma modalidade da descrição, as composições de proteína de ligação podem ser preparadas para armazenamento por mistura da composição selecionada tendo o grau de pureza desejado com agentes de formulação opcionais na forma de um bolo liofilizado ou uma solução aquosa. Além disso, a proteína de ligação pode ser formulada como um liofilizado usando excipientes apropriados, tais como sacarose.

[00315] As composições farmacêuticas da descrição podem ser selecionadas para entrega parenteral ou subcutâneo. Alternativamente, as composições podem ser selecionadas para inalação ou entrega através do trato digestivo, tal como oralmente. A preparação de tais composições farmacêuticamente aceitáveis está dentro habilidade da técnica.

[00316] Os componentes da formulação estão presentes em concentrações que são aceitáveis para o sítio de administração. Por exemplo, tampões são usados para manter a composição em pH fisiológico ou em pH ligeiramente mais baixo, geralmente dentro de uma faixa de pH de cerca de 5 a cerca de 8.

[00317] Quando a administração parenteral é contemplada, as composições terapêuticas para uso podem ser na forma de uma solução aquosa isenta de pirogênio, parenteralmente aceitável, compreendendo a proteína de ligação desejada em um veículo farmacêuticamente aceitável. Um veículo particularmente adequado para injeção parenteral é água destilada estéril, na qual uma proteína de ligação é formulada como uma solução isotônica estéril, adequadamente preservada. Ainda outra preparação pode envolver a formulação da molécula desejada com um agente, tal como microesferas injetáveis, partículas biodegradáveis, compostos poliméricos (tais como ácido polilático ou

ácido poliglicólico), esferas ou lipossomas, que provê a liberação controlada ou sustentada do produto que pode, então, ser entregue através de uma injeção de depósito. Ácido hialurônico também pode ser usado, e isso pode ter o efeito de promover duração sustentada na circulação. Outros meios adequados para a introdução da molécula desejada incluem dispositivos de entrega de droga implantáveis.

[00318] Em uma modalidade, uma composição farmacêutica pode ser formulada para inalação. Por exemplo, uma proteína de ligação pode ser formulada como um pó seco para inalação. Soluções de inalação de proteínas de ligação também podem ser formuladas com um propulsor para a entrega de aerossóis. Ainda em outra modalidade, as soluções podem ser nebulizadas.

[00319] Contempla-se também que determinadas formulações podem ser administradas oralmente. Em uma modalidade da descrição, as proteínas de ligação que são administradas dessa maneira podem ser formuladas com ou sem os veículos habitualmente usados na composição de formas de dosagem sólidas, tais como comprimidos e cápsulas. Por exemplo, uma cápsula pode ser projetada para liberar a porção ativa da formulação no ponto do trato gastrointestinal quando a biodisponibilidade é maximizada e a degradação pré-sistêmica é minimizada. Agentes adicionais podem ser incluídos para facilitar a absorção da proteína de ligação. Diluentes, aromatizantes, ceras de baixo ponto de fusão, óleos vegetais, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de desintegração de comprimidos e aglutinantes também podem ser usados.

[00320] Outra composição farmacêutica pode envolver uma quantidade eficaz de proteínas de ligação em uma mistura com excipientes não tóxicos que são adequados para a fabricação de comprimidos. Dissolvendo os comprimidos em água estéril, ou outro veículo apropriado, as soluções podem ser preparadas na forma de

dose unitária. Excipientes adequados incluem, mas sem limitação, diluentes inertes, tais como carbonato de cálcio, carbonato ou bicarbonato de sódio, lactose ou fosfato de cálcio; agentes de ligação, tais como amido, gelatina ou acácia; agentes lubrificantes, tais como estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco.

[00321] Composições farmacêuticas adicionais da descrição serão evidentes para os versados na técnica, incluindo formulações envolvendo proteínas de ligação em formulações de entrega controlada ou sustentada. Técnicas para formular uma variedade de outros meios de entrega controlada ou sustentada, tais como veículos lipossômicos, micropartículas biodegradáveis ou esferas porosas e injeções de depósito, também são conhecidas pelos versados na técnica. Exemplos adicionais de preparações de liberação sustentada podem incluir matrizes poliméricas semipermeáveis na forma de artigos moldados, por exemplo, películas, ou microcápsulas. Matrizes de liberação sustentada podem incluir poliésteres, hidrogéis, polilactidas, copolímeros de ácido L-glutâmico e gama-etil-L-glutamato, poli(2-hidroxietil-metacrilato), etileno vinil acetato ou ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. As composições de liberação sustentada também podem incluir lipossomos, que podem ser preparados por qualquer um dos vários métodos conhecidos na técnica.

[00322] As composições farmacêuticas a serem usadas para administração *in vivo* normalmente devem ser estéreis. Isso pode ser realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis. Quando a composição é liofilizada, a esterilização usando esse método pode ser realizada antes ou após a liofilização e reconstituição. A composição para administração parenteral pode ser armazenada em forma liofilizada ou em solução. Além disso, as composições parentéricas geralmente são colocadas em um recipiente tendo uma porta de acesso estéril, por exemplo, um saco ou frasco de solução

intravenosa com uma tampa perfurável por uma agulha de injeção hipodérmica.

[00323] Uma vez que a composição farmacêutica tenha sido formulada, ela pode ser armazenada em frascos estéreis como solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou como um pó desidratado ou liofilizado. Tais formulações podem ser armazenadas em uma forma pronta para uso ou em uma forma (por exemplo, liofilizada) que requer reconstituição antes da administração.

[00324] A descrição também inclui kits para produzir uma unidade de administração de dose única. Os kits podem, cada um, conter um primeiro recipiente tendo uma proteína seca e um segundo recipiente tendo uma formulação aquosa. Também estão incluídos no escopo desta descrição kits que contêm seringas pré-cheias multicâmara ou de câmara única (por exemplo, seringas líquidas e lio-seringas).

[00325] A quantidade eficaz de uma composição farmacêutica de proteína de ligação a ser usada terapeuticamente dependerá, por exemplo, do contexto e objetivos terapêuticos. Portanto, um versado na técnica apreciará que os níveis de dosagem apropriados para tratamento variarão dependendo, em parte, da molécula entregue, da indicação para a qual a proteína de ligação está sendo usada, da via de administração e do tamanho (peso corporal, superfície corporal ou tamanho do órgão) e condição (idade e saúde geral) do paciente. PO conseguinte, o médico pode titular a dosagem e modificar a via de administração para obter o efeito terapêutico ideal.

[00326] A frequência de dosagem dependerá dos parâmetros farmacocinéticos da proteína de ligação na formulação que está sendo usada. Tipicamente, um médico administrará a composição até que uma dosagem seja alcançada e atinja o efeito desejado. A composição pode, portanto, ser administrada como uma dose única, como duas ou mais doses (que podem ou não conter a mesma quantidade da molécula

desejada) ao longo do tempo, ou como uma infusão contínua através de um dispositivo de implante ou cateter. Refinamento adicional da dosagem apropriada é feito rotineiramente por aqueles versados na técnica e está dentro do âmbito de tarefas rotineiramente realizadas por eles. Dosagens apropriadas podem ser verificadas através do uso de dados de dose-resposta apropriados.

[00327] A via de administração da composição farmacêutica é de acordo com métodos conhecidos, por exemplo, oralmente; através de injeção por via intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparênquima), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intra-arterial, intraportal ou intralesional; por sistemas de liberação sustentada; ou por dispositivos de implante. Quando desejado, as composições podem ser administradas por injeção em bolus ou continuamente por infusão ou por dispositivo de implante.

[00328] A composição também pode ser administrada localmente através do implante de uma membrana, esponja ou outro material apropriado no qual a molécula desejada tenha sido absorvida ou encapsulada. Quando um dispositivo de implante é usado, o dispositivo pode ser implantado em qualquer tecido ou órgão adequado, e a entrega da molécula desejada pode ser realizada por difusão, bolus de liberação programada ou administração contínua.

EXEMPLOS

[00329] Os exemplos que seguem são ilustrativos de modalidades específicas da descrição, e vários usos das mesmas. São apresentados apenas para fins explicativos, e não devem ser interpretados como limitando o escopo da invenção de forma alguma.

[00330] A terminologia a seguir pode ser usada de forma intercambiável nos Exemplos e Desenhos neste documento para se referir a anticorpos ou domínios de ligação a antígeno anti-CD38 específicos:

antiCD38_C2-CD38-1: mAb1

antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 ou CD38_{VH1}: mAb2

antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3: mAb3

antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3: mAb4

antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3: mAb5

antiCD38_1370 ou CD38_{HHY1370}: mAb6

antiCD38_SB19 ou isatuximab: mAb7.

Exemplo 1: Geração e Caracterização de Anticorpos anti-CD38

Monoclonais

[00331] Os exemplos que seguem descrevem a geração e caracterização de anticorpos anti-CD38 monoclonais. Vantajosamente, os anticorpos providos neste documento reagem de forma cruzada com proteínas CD38 humanas e de macaco, provendo assim moléculas que podem ser usadas para estudos clínicos e de segurança. Esses anticorpos são também capazes de exterminar células CD38+ por apoptose e citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC).

[00332] Este Exemplo descreve um fluxo de trabalho eficiente para gerar anticorpos monoclonais reativos de forma cruzada e específicos de CD38 de células B de murino únicas.

Materiais e Métodos

Generação de anticorpos monoclonais

[00333] Anticorpos para CD38 humano foram gerados usando o domínio extracelular de CD38 humano R45-I300 (SEQ ID NO: 1). Ver Q. Liu, I. Krilksunov, R. Graeff, C. Munshi, H.C. Lee, e Q. Hao 2005 Structure 13::1331-1339. O imunogênio foi administrado diretamente, com um adjuvante para estimular a resposta imune, tanto a camundongos BalbC normais quanto a camundongos Trianni™ transgênicos (Trianni, São Francisco, CA), compreendendo o DNA codificador de regiões variáveis de cadeia leve kapa e pesada de

imunoglobulina humana.

[00334] Várias proteínas CD38 recombinantes derivadas da isoforma A com diferentes mutações de ponto e etiqueta foram usadas (SEQ ID NOs: 2, 3, 4 e 28), e uma versão marcada da isoforma E de CD38 (SEQ ID NO: 105) abrangendo o domínio extracelular de CD38 de R45-P203. As proteínas foram produzidas por expressão transiente em células de mamíferos. As sequências de DNA codificadoras foram clonadas em plasmídeos de expressão de mamíferos sob sinais de polyA SV40 e intensificador/promotor de CMV. Células HEK293 (Invitrogen; #K9000-10) foram transfectadas transientemente com os plasmídeos de expressão usando o Sistema de Expressão FreeStyle™ MAX 293 de acordo com as instruções do fabricante.

Imunização de camundongos e seleção única de células B

[00335] Anticorpos anti-CD38 também foram isolados diretamente de células B positivas para antígeno sem fusão a células de mieloma. Usando esse método, foram obtidos vários anticorpos anti-CD38, tais como mAb1 (ver SEQ ID NOs: 5 e 6 para sequências VH e VL, respectivamente, e SEQ ID NOs: 7 e 8 para sequências de cadeia pesada e cadeia leve, respectivamente). Resumidamente, camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas de idade (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) receberam, cada um, três rodadas de imunização ao longo de um curso de 41 dias usando o método clássico como descrito por A. Wennerberg et al. (1993 Am. J. Pathol. 143:1050-1054). O antígeno foi administrado intraperitonealmente ao sítio ventral de camundongos. Três dias após a última injeção, os camundongos foram sacrificados e os baços foram isolados assepticamente e lavados com meio RPMI fresco. Os linfócitos foram liberados do baço e a suspensão unicelular foi lavada duas vezes com meio RPMI antes de ser classificada usando uma estratégia de classificação de quatro cores, incluindo um painel de anticorpos

fluorescentes e proteínas CD38 humanas e de macaco duplas e, em seguida, foram separados usando classificação celular por citometria de fluxo para isolar células B específicas de IgG-CD38 reativas cruzadas humanas/de macaco. As células únicas foram diretamente classificadas em tubos de PCR para amplificar o par cognato de genes VH e VL por RT-PCR (T. Tiller, C. Busse and H. Wardemann 2009 J. Immunol. Methods 350:183-193). O DNA resultante foi sequenciado.

[00336] O DNA resultante foi clonado em um vetor de expressão de mamífero que codifica, respectivamente, os domínios de IgG1 humana ou Ck humano para expressão transiente em células HEK293 usando Sistema de Expressão FreeStyle™ MAX 293, de acordo com as instruções do fabricante. Os lotes foram purificados por cromatografia de afinidade com Proteína A (MabSelect, GE Healthcare). O eluato foi dialisado contra PBS antes da filtração estéril e armazenamento a 4°C.

Geração de anticorpos por imunização em camundongos transgênicos de imunoglobulina humana e seleção usando tecnologia de hibridoma

[00337] As imunizações, a fusão e a triagem foram realizadas usando células de mieloma P3X63-Ag8.653 com o domínio extracelular de CD38 humano, como descrito em Kilpatrick et al. 1997 Hybridoma 16:381389. Usando o método RIMMS descrito por Kilpatrick et al., camundongos Trianni™ transgênicos, fêmea de 6-8 semanas de idade compreendendo o DNA codificando regiões variáveis de cadeia leve kapa e pesada de imunoglobulina humana receberam quatro rodadas de imunização ao longo de 14 dias em intervalos de 3-4 dias. A proteína CD38 emulsificada em adjuvante de RIBI (Sigma #T2684) foi administrada por via subcutânea a seis sítios proximais aos linfonodos de drenagem, ao longo das costas dos camundongos e a seis sítios justapostos ao longo do abdômen. Quatro dias após a última injeção, os camundongos foram sacrificados. Linfonodos poplíteos bilaterais, inguinais superficiais, axilares e branquiais foram isolados

aspticamente e lavados com meio RPMI fresco. Os linfócitos foram liberados dos linfonodos e a suspensão unicelular foi lavada duas vezes com meio RPMI antes de ser fundida com células de mieloma P3X63-AG8.653 usando polietileno glicol. Após a fusão, a mistura celular foi incubada em uma incubadora a 37°C por 16-24 horas. A preparação celular resultante foi transferida para meio semissólido seletivo e plaqueada aspticamente em placas de Petri de 100 mm e incubadas a 37°C. Dez dias após o início da seleção, as placas foram examinadas quanto ao crescimento de hibridomas, e as colônias visíveis foram coletadas e colocadas em placas de 96 cavidades contendo 200 µL de meio de crescimento. As placas de 96 cavidades foram mantidas em uma incubadora a 37°C por 2 a 4 dias. Usando essa técnica, e o imunógeno descrito acima, vários anticorpos quiméricos anti-CD38 foram obtidos, tais como mAb 6 (ver SEQ ID NOs: 9 e 10 para seqüências VH e VL, respectivamente, e SEQ ID NOs: 11 e 12 para seqüências de cadeia leve e cadeia pesada, respectivamente. As seqüências VH e VL foram recuperadas por RT-PCR e mAb 6 foi produzido por expressão transiente como descrito acima.

Afinidade de ligação a domínios extracelulares de CD38 solúvel

[00338] As propriedades de ligação dos mAbs anti-huCD38 foram avaliadas usando um BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ). Resumidamente, um chip biossensor CM5 BIAcore foi encaixado no instrumento e ativado com 250µl de NHS/EDC 1:1 à temperatura ambiente. Uma IgG1 Fc anti-humano de camundongo (GE Healthcare #BR-1008-39) (13,5 µg/ml em tampão de acetato a 0,05M, pH5) foi imobilizada nos chips ativados em células de fluxo 1. A imobilização foi realizada a uma taxa de fluxo de 5 µl/min. O chip foi, em seguida, bloqueado por injeção de 55 µl de etanolamina-HCl, pH 8,5, seguido por cinco lavagens com NaOH a 50 mM, NaCl a 1 M. Para medir a ligação de mAbs anti-CD38 à proteína CD38 humana ou à proteína CD38 de

cino, anticorpos foram usados a 2 µg/ml em tampão de corrida BIAcore (HBS-EP). Antígenos (CD38-histag humano (ID2) ou CD38-histag de cino (ID3)) foram injetados de 3 a 1000 nM. Após a conclusão da fase de injeção, a dissociação foi monitorada em um tampão de corrida BIAcore na mesma taxa de fluxo por 360 segundos. A superfície foi regenerada entre injeções usando 30 µl de NaOH a 50 mM-NaCl a 1 M. Sensorgramas individuais foram analisados usando o software BIAsimulation.

Afinidade de ligação a células pré-B de expressão de CD38 humanas

[00339] A ligação de anticorpos anti-CD38 a CD38 expresso na superfície de células preB::300,19 de murino recombinantes foi determinada por citometria de fluxo. A linhagem celular recombinante foi descrita por J. Deckert et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Células de expressão de CD38 preB::300,19 de murino foram revestidas a 40.000 células/cavidade em placa High Bind de 96 cavidades (MSD L15XB-3) e 100 µl/cavidade de anticorpos anti-CD38 foram adicionados por 45 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS 1% BSA. 100 µl/cavidade de IgG anti-humana de cabra conjugada com Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; #109-545-098) foram adicionados por 45 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS 1% BSA. A ligação de anticorpo foi avaliada após centrifugação e ressuspensão de células por adição de 200 µl/cavidade de PBS 1% de BSA e lida usando o Sistema de Citometria de Fluxo Guava® easyCyte™ 8HT. Os valores aparentes de KD e EC50 foram estimados usando o software BIOST@T-BINDING e BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Resultados

[00340] A ligação de mAb1 recém-isolado a células SU-DHL-8 ou MOLP-8 humanas foi comparada com a de isatuximab usando citometria de fluxo (Figura 1A). Ambos os anticorpos apresentaram ligação de alta afinidade a ambas as linhagens celulares. No entanto,

apenas mAb1 foi capaz de se ligar a células expressando CD38 de macaco cinomolgo na sua superfície (Figura 1B).

[00341] A ligação a domínios extracelulares solúveis de polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo foi examinada para anticorpos recém-isolados mAb1 e mAb6 usando ressonância de plasmons de superfície (SPR). Os resultados de SPR estão resumidos na Tabela A.

Tabela A. Afinidade de ligação de anticorpos ao domínio extracelular solúvel de hCD38 e cCD38 como determinado por ensaio SPR.

	hCD38-his (SEQ ID NO: 2)		cCD38-his (SEQ ID NO: 4)	
	Kd (s-1)	KD (M)	Kd (s-1)	KD (M)
mAb1	2,66E-04	3,36E-10	9,85E-05	3,90E-10
mAb6	2,03E-04	1,44E-09	1,90E-04	1,38E-09

[00342] Citometria de fluxo também foi usada para examinar a ligação de anticorpos anti-CD38 mAb1 e mAb6 a células pré-B de murino que expressam polipeptídeo CD38 humano ou de macaco cinomolgo na sua superfície celular. Os resultados são mostrados na Tabela B. Ambos os anticorpos testados mostraram alta afinidade de ligação a células expressando huCD38 ou cCD38 preB::300,19.

Tabela B. Afinidade de ligação de antibodies to hCD38 ou cCD38 expresso por murine preB::300,10 células como determinadas por citometria de fluxo.

	FACS de KD Aparente (M)	
	células expressando hCD38	células expressando cCD38
mAb1	2,80E-10	2,20E-10
mAb6	2,07E-09	1,14E-09

[00343] Esses resultados demonstram a geração de anticorpos que se ligam com alta afinidade a polipeptídeos CD38 humanos e de cinomolgo. Esses anticorpos, diferentemente de outros anticorpos anti-

CD38, reagem de forma cruzada com polipeptídeos CD38 humanos e de cinomolgo em forma extracelular solúvel ou expressos na superfície de células de mamíferos.

Exemplo 2: Projeto *in silico* de variantes anti-CD38 humanizadas

[00344] Este Exemplo descreve a humanização de anticorpos gerados no Exemplo 1.

[00345] As sequências de domínios variáveis mAb1 foram analisadas *in-silico*. O sistema de informação International ImMunoGeneTics para definição de imunoglobulinas (IMGT) foi usado para identificar regiões de determinação de complementaridade (CDRs).

[00346] Primeiramente, em paralelo, foram realizadas pesquisas para identificar a combinação de sequência de proteína de linha germinativa humana e linha germinativa de camundongo mais próxima para cada cadeia variável. Isso foi realizado com a uso de uma pesquisa de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) em bancos de dados de sequência de proteína de linha germinativa humana e de camundongo; para cada cadeia anticorpo, foram encontradas as sequências de proteína humana e de camundongo V e J mais próximas. A qualificação dessa alta identidade de sequência de proteína foi medida pela porcentagem de identidade da região V. Os resultados das pesquisas para cadeia leve e pesada de mAb1 são apresentadas nas Tabelas C e D, respectivamente.

Tabela C. Sequência de proteína de linha germinativa humana e de camundongo (V&J) mais próxima da cadeia leve variável de mAb1.

Espécie	Alelo V	Identidade de Sequência da Região V (%)	Alelo J
[Homo sapiens] Melhores Linhas Germinativas Funcionais	<u>IGKV4-1*01 (imgt)</u>	66,34 %	<u>IGKJ1*01 (imgt)</u>
	<i>Funcional</i>		<i>Funcional</i>

[Mus musculus] Melhores Linhas Germinativas Funcionais	<u>IGKV3-10*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>	96,97 %	<u>IGKJ1*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>

Tabela D. Sequência de proteína de linha germinativa humana e de camundongo (V&J) mais próxima da cadeia leve variável de mAb1.

Espécie	Alelo V	Identidade de Sequência da Região V (%)	Alelo J
[Homo sapiens] Melhores Linhas Germinativas Funcionais	<u>IGHV1-3*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>	69,39 %	<u>IGHJ4*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>
[Mus musculus] Melhores Linhas Germinativas Funcionais	<u>IGHV1-12*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>	87,76 %	<u>IGHJ3*01 (imgt)</u> <i>Funcional</i>

[00347] Em seguida, as sequências de domínio variável de mAb1 foram analisadas quanto a passivos de sequência, tais como desamidação clivagem ácida, oxidação ou sítios de formação de iso-aspartato. A estrutura de mAb1 foi analisada por modelagem 3D por homologia, a fim de definir como os resíduos de aminoácido interagem de forma intra- ou intermolecular. Essa etapa levou à identificação de um grupo de resíduos de aminoácido que são estruturalmente importantes para funcionalidades de mAb1, tais como conformação de CDRs e ligação de antígeno. Esses resíduos de aminoácido foram selecionados para estar presentes em sequências variáveis de mAb1 humanizado.

[00348] As CDRs de mAb1 de murino parental foram enxertadas nas estruturas de quadro relevantes. Com base nas análises acima, o IGKV3-20*02 humano acoplado com IGKJ1*01 e IGHV1-3*01 humano acoplado com IGHJ4*01 foram selecionados para ser a base da humanização cadeia leve variável e de cadeia pesada variável de mAb1, respectivamente. A cadeia leve de mAb1 apresentou 64,52% de identidade na região V com a linhagem germinativa de IGKV3-20*02

humana selecionada. A cadeia pesada de mAb1 apresentou 69,39% de identidade na região V com a linhagem germinativa de IGHV1-3*01 humana selecionada. Durante o processo de humanização, as CDRs de mAb1 de murino parentais foram transplantadas entre estruturas de quadro da linhagem germinativa selecionada, a fim de recompor sequências variáveis de anticorpo padrão. Atenção foi dada ao grupo previamente identificado de resíduos de aminoácido de mAb1, que são estruturalmente importantes para suas funcionalidades, como observado acima. Se necessário, os resíduos de aminoácidos foram substituídos nas sequências recém-criadas por seu resíduo de mAb1 correspondente exato. Isso corresponde a uma etapa de mutação reversa para incorporar resíduos de aminoácido da sequência parenteral adequada. Algumas mutações de CDR foram incorporadas para humanizar e evitar passivos de sequência nas CDRs parentais. As sequências variáveis leves e pesadas recém-criadas foram usadas para gerar modelos de homologia 3D da região variável humanizada de mAb1. Os modelos 3D foram construídos usando a suíte Model Antibody Framework do BIOVIA Discovery Studio.

[00349] Com base na abordagem de enxerto de CDR, duas variantes para a cadeia leve variável (VL1 e VL3) e quatro variantes para a cadeia pesada variável (VH1, VH3, VH5 e VH6) foram geradas. A combinação particular de resíduos de aminoácido que variam entre sequências leves e pesadas variáveis de mAb1 e suas versões humanizadas são apresentadas nas Tabelas E e Tabela F, respectivamente.

Tabela E. Diferenças de sequência entre a cadeia leve variável de mAb1 e variantes humanizadas.

Regiões de Ig (IMGT)	VL de mAb1 parental	VL1 humanizada	VL3 humanizada
FR1	S10	T	T
	A12	S	S
	V13	L	L

	L15	P	P
	Q17	E	E
CDR1	E27	Q	E
	D30	S	D
	N34	Q	N
FR2	K49	R	R
CDR2	L54	G	L
FR3	N57	S	S
	L58	R	R
	E59	A	A
	S60	T	T
	V62	I	I
	R72	G	G
	D80	S	S
	V82	L	L
	A84	P	P
	D85	E	E
	A87	F	F
	T89	V	V

Tabela F. Diferenças de sequência entre a cadeia pesada variável de mAb1 e variantes humanizadas.

Regiões de Ig (IMGT)	VH de mAb1 parental	VH1 humanizada	VH3 humanizada	VH5 humanizada	VH6 humanizada
FR1	Q5	V	V	V	V
	L11	V	V	V	V
	R13	K	K	K	K
	S14	P	P	S	P
	M20	V	V	V	M
CDR1	F32	Y	F	F	F
	N33	A	N	N	N
FR2	T40	A	A	A	A
	G44	R	R	G	R
CDR2	N55	Q	N	N	N
FR3	K65	Q	Q	Q	Q
	K67	R	R	R	R
	S76	A	A	A	A
	Q82	E	E	E	E

	I83	L	L	I	I
	T87	R	R	R	R
	S91	T	T	T	T

[00350] A variante VL1 humanizada com SEQ ID NO: 14 exibe um total de 22 mutações (18 em FRs e 4 em CDRs) em comparação com a VL parental de sequência de mAb1 com SEQ ID NO: 6. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhagens germinativas humanas IGKV3-20*02 acopladas com IGKJ1*01 com 8 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura de mAb, conformação de CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo. Quatro posições das CDRs parentais foram alteradas para aumentar a taxa de humanização ou evitar passivos de sequência.

[00351] A variante VL3 humanizada com SEQ ID NO: 18 exibe um total de 18 mutações (18 em FRs) em comparação com a VL parental de sequência de mAb1 com SEQ ID NO: 6. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhagens germinativas humanas IGKV3-20*02 acopladas com IGKJ1*01 com 8 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura do mAb, conformação de CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo.

[00352] A variante VH1 humanizada com SEQ ID NO: 13 exibe um total de 17 mutações (14 em FRs e 3 em CDRs) em comparação com a VH parental de sequência de mAb1 com SEQ ID NO: 5. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhagens germinativas humanas IGHV1-3*01 acopladas com IGHJ4*01 com 11 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura do mAb, conformação das CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo. Três posições das CDRs parentais foram alteradas para aumentar a taxa de humanização ou evitar passivos de sequência.

[00353] A variante VH3 humanizada com a SEQ ID NO: 17 exibe um total de 14 mutações (14 em FRs) em comparação com a VH parental

de sequência de mAb1 com a SEQ ID NO: 5. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhagens germinativas humanas IGHV1-3*01 acopladas com IGHJ4*01 com 11 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura de mAb, conformação de CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo.

[00354] A variante VH5 humanizada com a SEQ ID NO: 21 exibe um total de 11 mutações (11 em FRs) em comparação com a VH parental de sequência de mAb1 com a SEQ ID NO: 5. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhas germinativas humanas IGHV1-3*01 acopladas com IGHJ4*01 com 14 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura do mAb, conformação de CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo.

[00355] A variante VH6 humanizada com SEQ ID NO: 23 exibe um total de 12 mutações (12 em FRs) em comparação com a VH parental de sequência de mAb1 com SEQ ID NO: 5. Essa variante derivada de estruturas de quadro de linhagens germinativas humanas IGHV1-3*01 acopladas com IGHJ4*01 com 13 mutações reversas realizadas devido ao risco de impacto negativo na estrutura do mAb, conformação de CDRs e, portanto, na ligação ao seu alvo.

[00356] As sequências variáveis humanizadas leves e pesadas resultantes foram analisadas quanto à similaridade de sequência com o banco de dados Immune Epitope Data Base (IEDB) ((PLoS Biol (2005) 3 (3)e91) www.iedb.org) para garantir que nenhuma das sequências continha qualquer epítipo de célula B ou T conhecido listado.

[00357] As sequências variáveis de aminoácido completas de domínios variáveis leves e pesados humanizados e de mAb1 são apresentadas na Tabela G. Esses domínios variáveis leves e pesados humanizados foram combinados para gerar várias versões humanizadas de domínios variáveis parentais de mAb1. Os domínios variáveis de mAb2 correspondem à associação de VH1 humanizado

combinado com VL1 humanizado. Os domínios variáveis de mAb3 correspondem à associação de VH3 humanizado combinado com VL3 humanizado. Os domínios variáveis de mAb4 correspondem à associação de VH5 humanizado combinado com VL3 humanizado. Os domínios variáveis de mAb5 correspondem à associação de VH6 humanizado combinado com VL3 humanizado. As proteínas de ligação triespecíficas mostradas na Tabela G são descritas mais detalhadamente no Exemplo 4.

[00358] As sequências de DNA codificadoras correspondentes das variantes de VH e VL humanizadas descritas acima foram clonadas em um vetor de expressão de mamífero codificando respectivamente os domínios de IgG1 humano ou Ck humano para expressão transiente e purificação como descrito no Exemplo 1. As sequências de aminoácido das variantes anti-CD38 humanizadas de comprimento total derivadas de mAb1 são listadas como mAb2 (cadeia pesada: HC1, SEQ ID NO: 15; cadeia leve: LC1, SEQ ID NO: 16), mAb3 (cadeia pesada: HC3, SEQ ID NO: 19; cadeia leve: LC3, SEQ ID NO: 20), mAb4 (cadeia pesada: HC5, SEQ ID NO: 22; cadeia leve: LC3, SEQ ID NO: 20), e mAb5 (cadeia pesada: HC6, SEQ ID NO: 24; cadeia leve: LC3, SEQ ID NO: 20).

Exemplo 3: Reatividade cruzada e indução de apoptose de anticorpos anti-CD38

[00359] As variantes anti-CD38 humanizadas geradas no Exemplo 2 foram posteriormente caracterizadas para ligação a polipeptídeos CD38 humano e de cinomolgo e indução de apoptose.

Materiais e Métodos

Ensaio de Indução de Apoptose

[00360] As células foram incubadas a 2×10^5 células/ml em meio completo (RPMI-1640, 10% FBS, 2mM de L-glutamina) com 1,5 µg/ml (10 nM) de anticorpos indicados por 20 horas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram manchadas com Anexina V-FITC de acordo com as

instruções do fabricante (Life Technologies). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo em um citômetro de fluxo BD FACS Aria™ com o software BD FACSDiva para controle de aquisição e análise de dados (ambos BD Biosciences).

Resultados

[00361] As propriedades de ligação de anticorpos CD38 anti-humanos selecionados produzidos como descritos acima foram examinados (Figuras 2A-2H). A ligação de anticorpos a CD38 humano solúvel e CD38 de macaco cinomolgo foi examinada usando ELISA e SPR. Os dados de ELISA foram usados para determinar o EC₅₀ de ligação de anticorpo a CD38 humano e de macaco para anticorpos anti-CD38 humanizados mAb2 (Figura 2A), mAb3 (Figura 2C), mAb4, mAb5 (Figura 2E) e anticorpo anti-CD38 humano mAb6 (Figura 2I).

[00362] A ligação das variantes anti-CD38 humanizadas ou mAb anti-CD38 humano a CD38 também foi avaliada usando o ensaio SPR descrito acima. Os dados de SPR foram usados para determinar a K_D e K_{off} de ligação de anticorpo CD38 humano e de macaco cinomolgo para anticorpos anti-CD38 humanizados mAb2 (Figura 2B), mAb3 (Figura 2D), mAb4, mAb5 (Figura 2F) e anticorpo anti-CD38 humano mAb6 (Figura 2H). Os dados de ligação estão resumidos na Tabela K e mostram que todos os mAbs anti-CD38 se ligam a CD38 com características de ligação semelhantes.

Tabela K. Afinidade de ligação de mAbs anti-CD38 ao domínio extracelular solúvel de CD38 humano e CD38 de cinomolgo como determinado por ensaio de ressonância de plasmons de superfície.

	hCD38-his (SEQ ID NO: 2)		cCD38-his (SEQ ID NO: 4)	
	Kd (s-1)	KD (M)	Kd (s-1)	KD (M)
mAb1	2,66E-04	3,36E-10	9,85E-05	3,90E-10
mAb2	3,90E-04	3,32E-10	7,84E-04	3,44E-09
mAb3	2,83E-04	4,83E-10	1,29E-04	7,10E-10
mAb4	5,29E-04	8,22E-10	2,01E-04	1,14E-09
mAb5	3,33E-04	3,12E-10	1,25E-04	5,63E-10
mAb6	2,03E-04	1,44E-09	1,90E-04	1,38E-09

[00363] A capacidade das variantes anti-CD38 humanizadas de se ligarem a células expressando CD38 foi avaliada usando o ensaio de ligação baseado em FACS descrito acima. Os dados de FACS foram usados para determinar o EC50 de ligação de anticorpo a CD38 humano e de macaco cinomolgo para anticorpos anti-CD38 humanizados mAb2 (Figura 2A), mAb3 (Figura 2C), mAb4, mAb5 (Figura 2E) e anticorpo anti-CD38 humano mAb6 (Figura 2G). Os dados de ligação, apresentados na Tabela L, mostram que todas as variantes anti-CD38 humanizadas apresentaram afinidades de ligação semelhantes para CD38 de superfície celular.

Tabela L. Afinidade de ligação de anti-CD38 mAbs a CD38 expressando murine preB::300,19 cells.

	FACS de KD Aparente (M)	
	células expressando hCD38	células expressando cCD38
mAb1	2,80E-10	2,20E-10
mAb2	3,30E-10	7,50E-10
mAb3	7,80E-10	1,31E-09
mAb4	5,50E-10	1,15E-09
mAb5	6,80E-10	1,07E-09
mAb6	2,07E-09	1,14E-09

[00364] Os dados de ligação dos três ensaios estão resumidos na Figura 2I, juntamente com a identidade de sequência dos domínios VL e VH para regiões V humanas.

[00365] A capacidade do anticorpo mAb1 parental e mAb7 para induzir apoptose foi examinada em seguida. Ambos os anticorpos aumentaram o mancha com Anexina V e absorção de iodeto de propídio (PI). 40% das células se tornaram duplamente positivas para Anexina V e PI após o tratamento com mAb7, enquanto 60% das células tratadas com mAb1 foram duplamente positivas. Ambos os anticorpos apresentaram efeito apoptótico dependente de concentração nas células SU-DHL-8 (Figura 2J). Da mesma forma, ambos os anticorpos

promoveram atividade de ADCC contra células SU-DHL-8 na presença de células NK92 (Figura 2K), levando a até 60% de citotoxicidade e um IC50 de 4-6pM após 4 horas a 37°C (Figura 2L).

[00366] Uma isoforma E de CD38 foi identificada *in silico* e validada no nível de transcrição de células NK, PBMCs e BMMCs a partir de linhagens celulares de câncer e pacientes com mieloma múltiplo (MOLP-8, CU1702 e CU2332). A isoforma E de CD38 foi evidenciada por uma triagem de banco de dados de sequência nucleica usando programa BLASTN 2.2.26 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller e David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acid Res. 25:3389-3402) em banco de dados de transcritos Human RefSeq, versão 20131216. O programa BLASTN foi aplicado sem mascarar regiões de baixa complexidade de sequência e considerando pelo menos: 98,5% de identidade com sequência nucleica de isoforma A de CD38 humano em uma extensão mínima de 100 resíduos de ácido nucleico. As sequências destacadas dessa triagem foram realinhadas com o locus do gene CD38 para serem validadas como sendo as formas transcricionais de gene CD38 humano (mesma estrutura genômica de íntron-exon). A sequência nucleica de isoforma E de CD38 foi uma das sequências validadas como sendo formas transcricionais do gene CD38 humano.

[00367] A capacidade de anticorpos anti-CD38 de se ligar a ambas isoformas A e E de CD38 humano também foi examinada. Para avaliar a ligação à isoforma A e isoforma E de CD38, um ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA) foi realizado usando proteínas de isoforma A e isoforma E (preparadas como descrito no Exemplo 1) como antígeno captador. Placas de 96 cavidades foram revestidas com qualquer isoforma a 0,5 µg/cavidade em PBS e 100

µl/cavidade de anticorpos foram adicionados à placa. A placa foi incubada a 37°C por 1h e lavada cinco vezes com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Em seguida, 100 µl de uma diluição 1:25.000 de IgG anti-humana, conjugada com peroxidase de rábano silvestre, (Jackson Ref: 109-035-098) foram adicionados a cada cavidade. Após incubação a 37°C por 1 h no escuro, as placas foram lavadas com PBS-T cinco vezes. A ligação de anticorpo foi visualizada por adição de tampão TMB-H₂O₂ e leitura a um comprimento de onda de 450 nM. Os valores de EC₅₀ foram estimados usando software BIOST@T-SPEED.

[00368] A afinidade de ligação de vários anticorpos à isoforma A (SEQ ID NO: 1) e isoforma E (SEQ ID NO: 105) de CD38 foi determinada, como mostrado na Tabela L2. A Tabela M fornece uma comparação das propriedades de ligação para vários anticorpos anti-CD38.

Tabela L2. Afinidade de ligação de anticorpos anti-CD38 para isoformas A e E de CD38, com base em EC₅₀ como determinado por ELISA.

Anticorpo	EC ₅₀ de isoforma A de CD38 (nM)	EC ₅₀ de isoforma E de CD38 (nM)
mAb1	0,11 (CV 9 %)	0,08 (CV 7%)
mAb2	0,14 (CV 13%)	0,10 (CV 12%)
mAb6	0,47 (CV 3,7%)	0,32 (CV 5%)
mAb7	0,10 (CV 7,1%)	Nenhuma ligação

Tabela M. Características de ligação de vários anticorpos anti-CD38.

Anti-CD38	H11 (Santa Cruz)	Daratumumab	mAb7	mAb1	mAb6
Ligação à isoforma A de huCD38	+	+	+	+	+
Ligação à isoforma E de huCD38	+	-	-	+	+
Ligação a CD38 de cino	+	-	-	+	+

[00369] Em conclusão, ambos mAb7 e mAb1 induzem apoptose semelhante em células de mieloma múltiplo humano MOLP-8, efeito apoptótico dependente de concentração semelhante contra células SU-DHL-8, e atividade ADCC dependente de concentração semelhante contra células SU-DHL-8. No entanto, apenas mAb1 ligou-se a ambos CD38 humano e de macaco cinomolgo com afinidade subnanomolar e ligou-se a isoformas A e E de CD38.

[00370] A capacidade das variantes anti-CD38 humanizadas para induzir apoptose também foi avaliada por classificador de células ativadas por fluorescência (FACS), como descrito acima. Vários anticorpos anti-CD38 com várias propriedades funcionais foram identificados anteriormente, enquanto alguns deles podem mediar o extermínio *in vitro* de linhagens de células CD38+ através de impacto direto na proliferação ou apoptose celular. Os resultados de ensaios de indução de apoptose são como mostrados na Figura 2M. Todos os anticorpos gerados nos Exemplos 1 e 2 foram capazes de induzir apoptose, exceto mAb6. Anticorpos anti-CD38 mAb2, mAb3, mAb4 e mAb5 levaram a uma indução de apoptose dependente de dose em células de linfoma SU-DHL-8; IC50 para cada anticorpo é fornecido nas Figuras 2N-2Q.

Exemplo 4: Geração de proteínas de ligação anti-CD38 triespecíficas

[00371] Em seguida, as propriedades de ligação dos domínios de ligação a antígeno de anticorpos anti-CD38 selecionados descritos nos Exemplos 1-3 foram analisadas no formato triespecífico mostrado na Figura 3A.

[00372] Os domínios de ligação a antígeno anti-CD38 foram testados no formato triespecífico (anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3) quanto à capacidade de ligar CD38 quando outros domínios de ligação a antígeno estão ligados a seus ligandos cognatos usando SPR. O ensaio de ligação de ligando sequencial é mostrado na Figura 3B. Para ligação

sequencial dos três antígenos a cada Ab triespecífico, a concentração de saturação (> 10 KD) de cada antígeno foi injetada por 8 minutos, seguidos por 5 minutos de dissociação. O regenerado de superfície foi conduzido por injeção de 10 mM de Glicina-HCl pH 2,5 por 60 s a 30 μ l/min. Os dados foram ajustados com o modelo de ligação cinética 1:1 e analisados usando Biacore S200 Evaluation Software v 1.0. A constante de dissociação de equilíbrio (K_D) foi calculada usando a constante de taxa de associação (k_{on}) e a constante de taxa de dissociação (k_{off}).

[00373] Como mostrado na Figura 3C, esse ensaio baseado em SPR mostrou que as proteínas de ligação triespecíficas foram capazes de se ligar a CD38, independentemente de os domínios de ligação a antígeno CD3 e/ou CD28 também estarem ligados a seu antígeno cognato. Os resultados de um ensaio de ligação sequencial exemplificativo são mostrados na Figura 4. Parâmetros cinéticos como medidos por SPR são fornecidos na Tabela M2.

Tabela M2. Ligação de proteínas de ligação anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 triespecíficas a 1, 2 ou 3 antígenos cognatos.

Estado de proteína de ligação antes da ligação de CD38	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Sem pré-ligação	9,02E+05	1,42E-03	1,57E-09
CD3 pré-ligado	8,35E+05	1,24E-03	1,48E-09
CD28 pré-ligado	7,39E+05	1,32E-03	1,79E-09
CD3 pré-ligado, em seguida, CD28	8,18E+05	1,23E-03	1,50E-09
CD28 pré-ligado, em seguida, CD3	8,37E+05	1,23E-03	1,47E-09

[00374] Esses resultados demonstram que todos os três alvos podem se ligar às proteínas de ligação triespecíficas simultaneamente. Pré-ligação das proteínas de ligação triespecíficas com CD28, CD3 ou ambos (em qualquer ordem) não alterou a cinética de ligação ou a afinidade de ligação para CD38.

[00375] Em seguida, cada domínio de ligação a antígeno da proteína de ligação triespecífica CD38_{SB19}×CD28_{sup}×CD3_{mid} foi avaliado por SPR quanto à capacidade de ligar antígeno cognato com e sem os outros dois domínios de ligação a antígeno em saturação. As Tabelas M3 e M4 mostram os resultados desses ensaios.

Tabela M3. Ligação alvo sem outros alvos presentes

Alvo	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)
CD38	8,04E+05	1,41E-03	1,75E-09
CD28	1,16E+05	3,14E-04	2,71E-09
CD3	2,90E+04	6,73E-04	2,32E-08

Tabela M4. Ligação alvo com outros alvos em saturação

Alvo	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	K_D (M)
CD38	5,93E+05	1,44E-03	2,42E-09
CD28	1,05E+05	3,96E-04	3,77E-09
CD3	1,27E+05	2,36E-03	1,86E-08

[00376] Como demonstrado nas Tabelas M3 e M4, o fato de ter dois alvos saturados por pré-ligação com antígeno não impactou a cinética ou afinidade de ligação do terceiro alvo para CD38 ou CD28. No caso de ligação a CD3, o CD38 e/ou CD28 pré-ligado resultou em cinética mais rápida (impacto de aproximadamente 4 vezes nos valores de k_{on} e k_{off}).

[00377] Os domínios de ligação a antígeno anti-CD38 foram testado em formato triespecífico com dois domínios de ligação a antígeno anti-CD28 (superagonista, "sup", e agonista convencional, "cvn") e dois domínios de ligação a antígeno anti-CD3 ("médio" e "baixo"). As sequências de domínio variável para esses domínios de ligação a antígeno são fornecidas como segue: anti-CD28_{sup}: SEQ ID NO: 49 (VH) e SEQ ID NO: 50 (VL); anti-CD28_{cvn}: SEQ ID NO: 51 (VH) e SEQ ID NO: 52 (VL); anti-CD3_{mid}: SEQ ID NO: 53 (VH) e SEQ ID NO: 54 (VL); anti-CD3_{low}: SEQ ID NO: 84 (VH) e SEQ ID NO: 85 (VL). Os resultados dos

ensaios de SPR avaliando a ligação de proteínas de de ligação triespecíficas são mostrados na Figura 5. Três domínios de ligação anti-CD38 tinham aproximadamente a mesma afinidade de ligação no formato de proteína de ligação triespecífica que em um formato monoespecífico. Ambos os domínios de ligação CD3 tinham aproximadamente a mesma afinidade de ligação nos formatos mono-, bi- e triespecífico. Os domínios de ligação CD28 devem ter uma afinidade de ligação um pouco mais baixa (mas ainda nanomolar) no formato bi- ou triespecífico, em comparação com o monoespecífico. Quando os outros dois domínios de ligação a antígeno foram saturados, os domínios de ligação anti-CD38_{SB19} e anti-CD28_{sup} tiveram afinidades de ligação semelhantes, em comparação com quando os outros dois domínios de ligação a antígenos não estão ligados a antígeno. No entanto, o domínio de ligação anti-CD3_{mid} mostrou cinética mais rápida quando os outros dois domínios de ligação a antígeno foram saturados. Esses resultados demonstram que domínios de ligação anti-CD38, anti-CD28 e anti-CD3 são compatíveis para uso com o formato de proteína de ligação triespecífica.

[00378] Os domínios de ligação a antígeno anti-CD38 gerados neste documento também foram comparados com o domínio de ligação anti-CD38 existente de mAb7 (ver SEQ ID NO: 47 para sequências VH e SEQ ID NO: 48 para sequências VL, respectivamente). A ligação de moléculas triespecíficas a CD38 expresso na superfície de células preB::300,19 de murino recombinantes foi determinada por citometria de fluxo e os anticorpos monovalentes anti-CD38 correspondentes foram testados em paralelo. A linhagem celular recombinante foi descrita por J. Deckert et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Células expressando CD38 preB::300,19 de de murino foram revestidas a 40.000 células/cavidade em placa de Alta Ligação de 96 cavidades (MSD L15XB-3) e 100 µl/cavidade de moléculas triespecíficas foram

adicionados por 45 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS 1% de BSA. 100 µl/cavidade de IgG anti-humana de cabra conjugada com Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; #109-545-098) foram adicionados por 45 minutos a 4°C e lavados três vezes com PBS 1% BSA. A ligação de anticorpo foi avaliada após centrifugação e ressuspensão de células por adição de 200 µl/cavidade de PBS 1% BSA e leitura usando o sistema de citometria de fluxo Guava® easyCyte™ 8HT. Os valores EC50 e KD aparente foram estimados usando o software BIOST@T-BINDING e BIOST@T-SPEED, respectivamente.

[00379] Citometria de fluxo foi usada como descrito acima para examinar a ligação de mAb7 ou da proteína de ligação triespecífica com domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb7 a células pré-B de murino expressando polipeptídeo CD38 humano ou de macaco cinomolgo em sua própria superfície celular. Como mostrado na Figura 6A, a proteína de ligação triespecífica CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid} com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb7 ligado a células expressando CD38 humano (esquerda superior) com afinidade aparente 8 vezes menor do que o anticorpo monoespecífico mAb7 (direita superior). Nem o anticorpo monoespecífico mAb7 (direita inferior) nem a proteína de ligação triespecifica com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb7 (esquerda inferior) ligou-se a células expressando CD38 de cinomolgo.

[00380] O domínio de ligação do anticorpo anti-CD38 humanizado mAb2 também foi testado em formatos triespecíficos para ligação a células expressando polipeptídeos CD38 humanos ou de cinomolgo. Como mostrado nas Figuras 6B-6D, e ao contrário de mAb7, proteínas de ligação triespecíficas CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid} e CD38xCD28_{cvn}xCD3_{mid} com domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb2, bem como o anticorpo monoespecífico de mAb2, foram capazes de se ligar a ambos os polipeptídeos CD38 humano e de

cinomolgo. A proteína de ligação triespecífica $CD38 \times CD28_{cyn} \times CD3_{mid}$ com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb2 ligado a células expressando CD38 humano com afinidade aparente 9 vezes menor que o anticorpo parental mAb2 (comparar Figura 6C superior com a Figura 6D superior). A proteína de ligação triespecífica $CD38 \times CD28_{cyn} \times CD3_{mid}$ com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb2 ligado a células expressando CD38 de cinomolgo com afinidade aparente 7,5 vezes menor que o anticorpo parental mAb2 (comparar Figura 6C inferior com a Figura 6D inferior). A proteína de ligação triespecífica $CD38 \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb2 ligado a células expressando CD38 humano com uma afinidade aparente 2,5 vezes menor que a proteína de ligação triespecífica $CD38 \times CD28_{cyn} \times CD3_{mid}$ com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb2 (comparar Figura 6C superior com Figura 6B superior).

[00381] O domínio de ligação de anticorpo anti-CD38 humanizado mAb6 também foi comparado com o anticorpo monoespecífico mAb6 para ligação a células expressando polipeptídeos CD38 humanos ou de cinomolgo. Embora o anticorpo monoespecífico mAb6 ligado a células expressando polipeptídeos CD38 humano (direita superior) ou de macaco cinomolgo (direita inferior) na faixa de nM (Figura 6E), a proteína de ligação triespecífica $CD38 \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ com o domínio de ligação a antígeno anti-CD38 de mAb6 ligado a células expressando polipeptídeos CD38 humano (esquerda superior) ou de macaco cinomolgo (esquerda inferior) sem saturação.

[00382] Em conclusão, descobriu-se que a afinidade para ligação de proteína de ligação triespecífica $CD38_{SB19} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ a CD38 humano está no mesmo intervalo, seja examinando a ligação a CD38 recombinante humano por SPR ou a CD38 humano expresso em uma superfície celular por citometria de fluxo (Figura 6F). Da mesma forma,

a afinidade de proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid/low} (domínio de ligação anti-CD38 de mAb2) e CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid/low} (domínio de ligação anti-CD38 de mAb2) para ligação a CD38 humano também está na mesma faixa em ambos os ensaios. Para CD38_{HHY1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid} (domínio de ligação anti-CD38 de mAb6), a K_D para ligar CD38 humano foi determinada por SPR como 1 nM, enquanto nenhum valor preciso de EC50 pôde ser estimado por citometria de fluxo. Um resumo de valores KD aparente (obtidos por análises FACS) de proteínas de ligação triespecíficas com vários domínios de ligação anti-CD38 é fornecido na Tabela M5.

Tabela M5. Resumo de valores de KD aparente obtidos por ensaios de citometria de fluxo

	FACS de KD aparente (M)	
	células expressando hCD38	células expressando cCD38
Triespecífica com <i>mAb2</i> antiCD38	4,4 nM	7,5 nM
Triespecífica com <i>mAb6</i> antiCD38	Sem saturação	Sem saturação
Triespecífica com <i>mAb7</i> antiCD38	4 nM	Sem ligação
<i>mAb2</i>	0,5 nM	1 nM
<i>mAb6</i>	11,2 nM	6,6 nM
<i>mAb7</i>	0,5 nM	Sem ligação

[00383] Como esperado, a proteína de ligação triespecífica ΔCD38×CD28_{sup}×CD3_{mid} sem o domínio de ligação anti-CD38 não se ligou a células que expressam polipeptídeos CD38 humanos ou de macaco cinomolgo (Figura 6G). Isso indica que a ligação observada neste ensaio foi específica para os domínios de ligação a antígeno

CD38.

Exemplo 5: Caracterização *in vitro* e *in vivo* de proteínas de ligação triespecíficas contendo mAb2 anti-CD38 e mAb6 anti-CD38

[00384] O Exemplo a seguir descreve experimentos que caracterizam a estabilidade, propriedades de ligação e atividades de novos acopladores de células T que contêm domínios variáveis derivados dos anticorpos mAb2 e mAb6. Anticorpos anti-CD38 x CD28 x CD3 adicionais foram gerados compreendendo variantes dos braços anti-CD38, CD3 e CD28 das proteínas de ligação triespecíficas. Os novos anticorpos anti-CD38/CD3/CD28 diferem em: 1) domínio de ligação anti-CD38 (mAb2 ou mAb6); 2) domínio de ligação anti-CD3 (CD3_{high} ou CD3_{low}; ver SEQ ID NOs: 84 e 85 para sequências VH e VL anti-CD3_{low}, respectivamente); 3) Domínio de ligação anti-CD28 (CD28_{sup} ou CD28_{cvn}). Dentro das combinações possíveis, uma coleção do anti-CD38 x CD28 x CD3 foi projetada, produzida e subsequentemente testada para várias funções.

Materiais e Métodos

Produção e purificação de proteínas de ligação triespecíficas

[00385] Proteínas de ligação triespecíficas foram produzidas por transfecção transiente de 4 plasmídeos de expressão em células Expi293 usando o Kit de Transfecção ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Em suma, 25% (p/p) de cada plasmídeo foram diluídos em Opti-MEM, misturados com reagente ExpiFectamine pré-diluído por 20-30 minutos em temperatura ambiente (RT), e adicionados a células Expi293 (2,5x10⁶ células/ml). Uma otimização de transfecção para determinar a melhor proporção de plasmídeos foi geralmente usada para produzir a proteína de ligação triespecífica com bom rendimento e pureza.

[00386] 4-5 dias após a transfecção, o sobrenadante de células transfectadas foi coletado e filtrado através de uma unidade de filtro de

0,45 µm (Nalgene). A proteína de ligação triespecífica no sobrenadante foi purificada usando um procedimento de 3 etapas. Primeiramente, purificação por afinidade com Proteína A foi usada, e o Ab ligado foi eluído usando o "Tampão de Eluição de IgG" (Thermo Fisher Scientific). Em segundo lugar, o produto foi dialisado contra PBS (pH 7,4) durante a noite com 2 mudanças no tampão PBS. Qualquer precipitado foi limpo por filtração através de uma unidade de filtro de 0,45 µm (Nalgene) antes da etapa seguintes. Em terceiro lugar, purificação por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) (Hiload 16/600 Superdex 200pg, ou Hiload 26/600 Superdex 200pg, GE Healthcare) foi usada para remover agregados e diferentes espécies na preparação. As frações foram analisadas em SDS-PAGE reduzido e não reduzido para identificar as frações que continham a proteína de ligação triespecífica monomérica antes de combiná-las. O anticorpo purificado pode ser dividido em alíquotas e armazenado a -80°C a longo prazo.

Ensaio ELISA

[00387] As propriedades de ligação dos anticorpos purificados foram analisadas usando os métodos ELISA ou SPR. Para ELISA, antígenos correspondentes para cada sítio de ligação na proteína de ligação triespecífica foram usados para revestir uma placa Imuno de 96 cavidades (Nunc 439454, Thermo Fisher Scientific) durante a noite a 4°C usando 2 µg/ml de cada antígeno em PBS (pH 7,4). A placa revestida foi bloqueada usando 5% de leite desnatado + 2% de BSA em PBS por uma hora à temperatura ambiente, seguida de lavagem com PBS+0,25% de Tween 20 três vezes (Aqua Max 400, Molecular Devices). Diluição em série de anticorpos (Abs de controle e triespecífico) foi preparada e adicionada às placas de ELISA (100 µl/cavidade em duplicata), incubada à temperatura ambiente por uma hora, seguida de lavagem 5 vezes com PBS+0,25% de Tween 20.

[00388] Após a lavagem, Fab anti-humano secundário conjugado

com HRP (1:5000, Cat. No. 109-035-097, Jackson ImmunoResearch Inc) foi adicionado a cada cavidade e incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. Após lavagem 5 vezes com PBS+0,25% de Tween 20, 100 µl de Substrato Peroxidase TMB Microwell (KPL, Gaithersburg, MD, EUA) foram adicionados a cada cavidade. A reação foi encerrada por adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M e OD₄₅₀ foi medido usando SpectraMax M5 (Molecular Devices) e analisado usando o software SoftMax Pro6.3 (Molecular Devices). Os dados finais foram transferidos para o software GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA), e plotados como mostrado. O EC₅₀ foi calculado usando o mesmo software.

[00389] Ensaio ELISA foi usado para determinar uma ligação de anticorpos triespecíficos anti-CD38xCD28xCD3 ou anticorpo de controle de isótipo (IgG4 humana) a CD3 humano (Cambridge Biologics LLC Cat #03-01-0051), CD28 (Cambridge Biologics LLC Cat #03-01-0303), e CD38 (Cambridge Biologics LLC Cat #03-01-0369). Os anticorpos ligados foram detectados usando um anticorpo secundário anti-Fab conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc #109-035-097).

Ensaio de Extermínio Celular *In Vitro*

[00390] PBMCs humanas purificadas foram usadas para ensaios de extermínio *in vitro* contra várias células de câncer usando diferentes proteínas de ligação triespecíficas. Em suma, o ensaio de extermínio foi configurado em placa com fundo em V de 96 cavidades. Para cada placa, 40 ml de PBMCs de cada doador foram plaqueadas a 2×10^6 células/ml, e 30 ml de células alvo rotuladas com PKH26 (Sigma #MINI26) a $2,5 \times 10^5$ células/ml (4µl de corante para manchar até 1×10^7 células) foram preparados. As primeiras proteínas de teste de 20 µl/cavidade em várias concentrações ou PMA foram adicionadas a cada cavidade, seguido por adição de 80 µl/cavidade de células alvo rotuladas em cada cavidade (2×10^4 células/cavidade). 100 µl de PBMC

foram adicionados a cada cavidade, atingindo E:T=10:1 cavidade (2×10^5 células/cavidade), e incubados por 24 horas em incubadora de CO₂ a 5% a 37°C. As células foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para medir a liberação de citocina ou descartado. As células foram manchadas com tampão de coloração de células mortas violeta fixável Vivid LIVE/DEAD™ (Life Technology #L34955) (o tampão de coloração foi preparado por adição de 60 µl de reagente Vivid em 60 ml de PBS). As células foram ressuspensas em 100 µl de tampão de coloração por incubação por 15 min à RT no escuro. Após a lavagem das células com 1xPBS, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS com 0,5% de paraformaldeído, e células de câncer PKH26+Vivid+ foram coletadas por citômetro de fluxo Fortessa (Beckton Dickinson, San Jose, CA), seguido por análise usando o software Flowjo. A porcentagem de extermínio é calculada como extermínio específico-extermínio espontâneo/células totais e plotada como mostrado.

Ensaio de Liberação de Citocina

[00391] Para medir as concentrações de citocina inflamatória nos ensaios de ativação *in vitro*, ensaios de extermínio *in vitro*, ensaios de ativação *in vivo* em células do cordão umbilical CD34+ de camundongos NSG humanizados, e o estudo de toxicidade, o sobrenadante de cultura celular foi coletado e as amostras de soro foram diluídas de acordo com o protocolo do fabricante usando o kit 13-plex de Células T Humanas de Alta Sensibilidade Milliplex (EMD Millipore). Esses foram posteriormente analisados por EMD Millipore MAGPIX® System e software MILLIPLEX® Analyst 5.1.

Modelos de camundongo *in vivo* e estudos de eficácia

[00392] Camundongos NSG enxertados com células-tronco hematopoéticas CD34+ humanas (hu-CD34) foram usados como modelo de camundongo *in vivo*. Esses camundongos desenvolvem células imune humanas de múltiplas linhagens, e são uma plataforma

validada para estudos de eficácia em imuno-oncologia (ver, por exemplo, Shultz, L.D. et al. (2014) Cold Spring Harb. Protoc. 2014:694-708). Os camundongos NSG Hu-CD34+ são produzidos por injeção de células-tronco hematopoiéticas CD34+, mostrando um enxerto multilinhagem eficaz de populações de células imunes humanas incluindo células T, células B e algumas outras populações (McDermott, SP et al. (2010) Blood 116:193- 200). A hematopoiese multilinhagem ocorre dentro de 12 semanas. O enxerto é estável por mais de um ano sem doença do enxerto *versus* hospedeiro.

[00393] Para o estudo de eficácia usando camundongos NSG hu-CD34, os camundongos foram adquiridos do The Jackson Laboratory (Maine, EUA), e as populações de células humanas foram validadas antes do uso. Em geral, 5×10^6 células tumorais misturadas em Matrigel (BD Biosciences) (50% v/v) foram usadas para inocular tumor em cada camundongo. Quando o tamanho do tumor atingiu a faixa de 100-150 mm³, os camundongos foram selecionados e randomizados em cada grupo para estudo. Os anticorpos foram administrados por via intravenosa em doses dadas 3 vezes por semana. O peso corporal foi monitorado 1-3 vezes por semana. O tamanho do tumor foi medido por medições de tumor com paquímetro 1-3 vezes/semana. Todos os camundongos foram extintos quando o tamanho do tumor atingiu 1.500 mm³, ou 24 horas após a última dose. Amostras de sangue terminal (0,3 ml) foram coletadas em tubos separadores de soro, misturadas invertendo suavemente cinco vezes e colocadas em um suporte para tubos. Os tumores terminais também foram coletados e pesados antes de serem fixados para análise imuno-histoquímica.

[00394] Camundongos NSG humanizados com PBMC humana (hu-PBMC) foram usados como outro modelo de camundongo *in vivo*. Esses camundongos são produzidos por injeção de PBMC humana purificada de doadores saudáveis, que apresentam a taxa de enxerto mais rápida

usando células mononucleares de sangue periférico adulto e permitem estudos de curto prazo que exigem uma função de células T e células NK de memória e efetora forte, além de serem adequados para estudo de eficácia de curto prazo (3-4 semanas) devido à doença do enxerto *versus* hospedeiro.

[00395] Para o estudo de eficácia usando camundongos NSG hu-PBMC, camundongos NSG de 8 a 10 semanas de idade (Cat. No: 005557, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) foram adquiridos do The Jackson Laboratory (Maine, EUA). Cada camundongo foi inoculado com 5×10^6 células tumorais misturadas em Matrigel (BD Biosciences) (50% v/v) por via subcutânea. Quando o tamanho do tumor atingiu a faixa de 50-100 mm³, 10×10^6 PBMCs humanas de doadores saudáveis foram reconstituídas para cada camundongo por via intraperitoneal (IP). A reconstituição de células humanas foi validada no dia seguinte. Quando o tamanho do tumor atingiu a faixa de 100-150 mm³, os camundongos foram selecionados e randomizados em grupo cada para estudo. Os anticorpos foram administrados por via intravenosa em doses dadas 3 vezes por semana. O peso corporal foi monitorado 1-3 vezes por semana. O tamanho do tumor foi medido por medições de tumor por paquímetro 1-3 vezes/semana. Todos os camundongos foram extintos quando o tamanho do tumor atingiu 1.500 mm³ ou 24 horas após a última dose. Amostras de sangue terminal (0,3 ml) foram coletadas em tubos separadores de soro, misturadas invertendo suavemente cinco vezes e colocadas em um suporte para tubos. Os tumores terminais também foram coletados e pesados antes de serem fixados para análise imuno-histoquímica.

[00396] Para o modelo disseminado de camundongo NSG hu-PMBC, foram injetadas $1-5 \times 10^6$ células em cada camundongo por via intravenosa no dia 0. No dia 3, imagem por luminância da linha de base foi tomada para randomização. No dia 4, 10×10^6 PBMCs humanas de

doadores saudáveis foram reconstituídas para cada camundongo por via intraperitoneal (IP). Os camundongos foram tratados semanalmente nos dias 5, 12, 19 usando doses indicadas. Imagem corporal por luminância semanal foi obtida nos dias 10, 17, 24 para monitorar o volume do tumor em cada animal. Ao término do estudo, sangue, baço, osso e medula óssea foram coletados para estudo histopatológico.

Resultados

[00397] A capacidade dos anticorpos de ligar todos os três antígenos alvo foi testada por ensaio ELISA. CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} IgG4, CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{low} IgG4, CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid} IgG4, CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{low} IgG4 mostraram afinidade de ligação similar para CD3 e CD38 humano e de macaco, mas afinidade de ligação variável para CD28 (humano e de macaco têm domínio extracelular idêntico) com CD28_{sup} mostrando melhor afinidade (Figura 7A). Variante FALA IgG4 e variantes LALA P329A e NNAS de IgG1 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} e CD38_{Hhy1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid} todas mostraram ligação similar a CD3, CD28 e CD38 humano (Figura 7B).

[00398] Em seguida, variantes da proteína de ligação anti-CD38×CD3×CD28 triespecífica foram testadas quanto à sua capacidade de induzir a ativação de células T e extermínio de células tumorais mediado por anticorpo (Figuras 8A- 8D). A Figura 8A mostra as atividades de extermínio *in vitro* de IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid}, IgG4 CD38_{hhy1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid}, IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid}, IgG4 CD38_{hhy1370}×CD28_{cvn}×CD3_{mid}, contra linhagem celular de mieloma múltiplo humano RPMI-8226 usando PBMC de 3 doadores diferentes a E:T=10. O EC50 da atividade de extermínio foi calculado e resumido na Tabela N. Ambas as proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38×CD3×CD28 contendo CD28_{sup} mostraram melhores atividades de extermínio. As atividades de extermínio *in vitro* dessas moléculas foram também examinadas usando NCI-H929 (Figura 8B), KMS-26 (Figura

8C), e linhagens celulares KMS-11 (Figura 8D).

[00399] Proteínas de ligação trispecíficas anti-CD38xanti-CD3xanti-CD28 com variantes LALA P329A e NNAS de IgG1, ou variante FALA de IgG4, também apresentaram extermínio *in vitro* de células KMS-11 (Figura 8E) e U266 (Figura 8F) de mieloma múltiplo. O EC50 para cada anticorpo contra cada linhagem celular foi calculado e resumido na Tabela Q2 (KMS-11) e Q3 (U266).

[00400] As Figuras 9A, 9B & 10 mostram o perfil de ativação de células T *in vitro* da IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} e IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{low}. Ambos os anticorpos mostraram atividades de ativação similares para células T CD4 e CD8. O EC50 para cada anticorpo contra cada linhagem celular foi calculado e resumido na Tabela N (RPMI-8226), Tabela O (NCI-H929), Tabela P (KMS-26) e Tabela Q (KMS-11).

Tabela N: Extermínio específico mediado por anticorpo de células RPMI8266 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores

Anticorpo	EC50 (ng/ml)		
	Doador #65	Doador #67	Doador #68
CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	5,30	1,95	3,3
CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	2,24	3,42	3,4
CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	8,31	29,52	46,8
CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	4,62	8,98	16,5

Tabela O: Extermínio específico mediado por anticorpo de células NCI-H929 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores

	EC50 (ng/ml)		
	Doador #65	Doador #67	Doador #68
CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	0,51	0,48	0,9
CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	0,94	1,84	2,5

CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	3,70	9,47	10,4
CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	2,31	6,39	7,2

Tabela P: Extermínio específico mediado por anticorpo de células KMS-26 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores

	EC50 (ng/ml)		
	Doador #65	Doador #67	Doador #68
CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	1,03	0,91	1,3
CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	3,95	5,06	5,3
CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	10,73	28,17	22,4
CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	15,84	32,10	25,7

Tabela Q: Extermínio específico mediado por anticorpo de células KMS-11 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores

	EC50 (ng/ml)		
	Doador #65	Doador #67	Doador #68
CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	3,05	3,40	14,7
CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4	4,17	7,74	25,1
CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	18,14	98,83	566,8
CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4	16,30	27,63	139,2

Tabela Q2: Extermínio específico mediado por anticorpo de células KMS-11 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores (Fcs de variante IgG1/4)

EC50 (pM) (KMS11)	CD38^{VH} 1xCD28^{sup} XCD3^{mid} IgG4 FALA	CD38^{VH1} xCD28^{su} pXCD3^{mi} d IgG1 LALA P329A	CD38^{VH1} xCD28^{su} pXCD3^{mi} d IgG1 NNAS	CD38^{hhy13} 70xCD28^{su} pXCD3^{mi} IgG4 FALA	CD38^{hhy1370} xCD28^{sup} XCD3^{mi} IgG1 LALA P329A	CD38^{hhy13} 70xCD28^s upXCD3^{mi} IgG1 NNAS
KP50901	3,879	4,375	4,411	7,731	9,311	17,71
KP50904	4,379	6,739	8,644	19,01	18,88	24,39

Tabela Q3: Extermínio específico mediado por anticorpo de células U266 CD38+ por PBMCs de diferentes doadores (Fcs de variante IgG1/4)

EC50 (pM) (U266)	CD38^{VH1} xCD28^s upXCD3^{mid} IgG4 FALA	CD38^V H1xCD28^{sup} XCD3^{mid} IgG1 LALA P329A	CD38^{VH1} xCD28^s upXCD3^{mid} IgG1 NNAS	CD38^{hhy1} 370xCD28^{sup} XCD3^{mi} IgG4 FALA	CD38^{hhy137} 0xCD28^{sup} XCD3^{mi} IgG1 LALA P329A	CD38^{hhy137} 0xCD28^{sup} XCD3^{mi} IgG1 NNAS
KP50901	1,879	1,031	1,150	2,691	1,597	2,816
KP50904	0,8657	3,570	2,018	2,112	0,8375	3,527

[00401] A produção de citocina induzida pelas variantes de proteína de ligação triespecíficas também foi examinada (Figuras 11A e 11B), usando o método usado em Stebbings, R. et al. (2007) (J. Immunol. 179:3325-3331) por revestimento da placa com anticorpos indicados, seguido de incubação com PBMC humana por 24 horas, usando 2 concentrações dos anticorpos de teste (5 µg/ml e 25 ng/ml). Os sobrenadantes de cultura de 24 horas foram coletados e usados para medir a concentração de IL2, IL6, IL10, IL12 e TNF-α, IFN-γ nos sobrenadantes, como descrito acima. IgG4 CD38^{VH1}xCD28^{sup}XCD3^{mid}, IgG4 CD38^{hhy1370}xCD28^{sup}XCD3^{mid}, IgG4 CD38^{VH1}xCD28^{cvn}XCD3^{mid},

IgG4 CD38_{hhy1370}XCD28_{cvn}XCD3_{mid} todas estimularam a produção de nível significativo de IL2, TNF- α e IFN- γ a 5 μ g/ml, mas falharam em induzir nível mensurável de qualquer citocina a 25 ng/ml, uma dose mostrando eficácia *in vivo* em 2 modelos de camundongo NSG humanizado.

[00402] A atividade antitumoral foi testada em modelos de camundongo *in vivo* para as variantes de proteínas de ligação triespecíficas (Figuras 12A-13F), como descrito acima. As Figuras 12A-12E mostram os resultados do estudo de eficácia *in vivo* usando o modelo de camundongo NSG enxertado com células-tronco hematopoiéticas CD34+ humanas (hu-CD34) implantado com linhagem celular MM humana RPMI-8226. IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} e anticorpos biespecíficos CD38xCD3 de controle com marcador de referência foram usados para tratar camundongos portadores de tumor nas doses indicadas 3QW (total de 6 doses). O peso corporal e o crescimento tumoral de cada camundongo foram medidos e plotados (Figuras 12A e 12E). Curva média de crescimento tumoral (Figura 12D), volume tumoral no dia 18 (Figura 12B) e peso do tumor terminal D19 (Figura 12C) para cada grupo também foram plotados. Todos os grupos tratados com IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} não apenas demonstraram eficácia estatística em comparação com controle de PBS, mas também demonstraram estatisticamente melhor eficácia na dose de 1 μ g/kg em comparação com anticorpo biespecífico CD38xCD3 de controle.

[00403] As Figuras 13A-13F mostram os resultados do estudo de eficácia *in vivo* usando o modelo de camundongo NSG humanizado com PBMC humana implantado com linhagem celular MM humana RPMI-8226. IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} e anticorpos biespecíficos CD38xCD3 de controle de referência foram usados para tratar camundongos portadores de tumor nas doses indicadas 3QW (total de

8 doses). O crescimento tumoral para cada camundongo foi medido e plotado (Figura 13A). Curva de crescimento tumoral médio (Figura 13F), volume tumoral no dia 4 (dia do início do tratamento; Figura 13B), volume tumoral no dia 21 (dia do último tratamento; Figura 13C), volume tumoral médio no dia 21 (Figura 13D) e peso tumoral terminal no dia 22 (Figura 13E) para cada grupo também foram plotados. Todos os grupos tratados com IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} não apenas demonstraram eficácia estatística em comparação com o controle de PBS, mas também demonstraram eficácia estatisticamente melhor em doses múltiplas em comparação com o anticorpo biespecífico CD38xCD3 de controle, indicando atividade antitumoral *in vivo* superior pelo anticorpo anti-CD38/CD3/CD28 triespecífico.

[00404] O anticorpo biespecífico CD38xCD3 de controle de referência compreende as seguintes sequências:

[00405] SEQ ID NO 108: cadeia pesada 1 de referência (liga CD38)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAPGKGL
 EWWSEINPQSSTINYATSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARYGNWFPYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
 AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPS
 DIAVEWESDGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWEQGD
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00406] SEQ ID NO 109: cadeia pesada 2 de referência (liga CD3)
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGL
 EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAED
 TAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGK
 PGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV

QQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE
 ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00407] SEQ ID NO 110: cadeia leve de referência (liga CD38)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVDTWVAWYQQKPGQSPKA
 LIYSASYRYSQVDRFTGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYFCQQYDSY
 PLTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR
 EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Exemplo 6: Estudo de escalonamento de dose com proteínas de ligação
 triespecíficas contendo mAb2 e mAb6 anti-CD38

Materiais e Métodos

[00408] Todos os estudos de NHP foram realizados por Covance (Princeton, Nova Jersey, EUA) de acordo com o protocolo Covance ICUCA. Macacos cinomolgos machos sem tratamento prévio com proteína ou sem tratamento prévio com proteína e droga foram usados em todos os estudos. Com base no projeto do estudo, os macacos foram selecionados e agrupados para cada proteína de ligação triespecífica. O anticorpo foi administrado por infusão intravenosa por 1 hora através da veia safena. Doses crescentes foram administradas em dias consecutivos para doses baixas ($<10 \mu\text{g/kg}$), mas com intervalo de 1-2 dias para doses mais altas ($> 10 \mu\text{g/kg}$) para fins de observação. Amostras de sangue foram coletadas a 0 hora (apenas no dia 1), 0,5 hora (infusão intermediária), 1 e 6 horas após o início da infusão para todos os animais após cada dose, como especificado. Amostras de sangue adicionais não programadas foram coletadas a critério do diretor

do estudo, patologista e/ou veterinário clínico. Todos os animais foram devolvidos à colônia no dia 60. PBMC e soro das amostras de sangue foram preparados usando métodos padrão, e conservados para análises futuras.

[00409] Sangue de primatas não humanos tratados foi manchado com anticorpos conjugados fluorescentemente contra marcadores de células T e IgG humana, fragmento Fcy e analisado em um citômetro de fluxo.

Resultados

[00410] Um estudo de toxicidade por escalonamento de dose usando proteínas de ligação triespecíficas de IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} contendo mAb2, IgG4 CD38_{hhy1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid} contendo mAb6, IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{cvn}XCD3_{mid} contendo mAb2, e IgG4 CD38_{hhy1370}XCD28_{cvn}XCD3_{mid} contendo mAb6 foi realizado em primatas não humanos. Todos os três domínios de ligação em 4 proteínas de ligação são reativos de forma cruzada com polipeptídeos CD38/CD3/CD28 de cinomolgo. O estudo foi desenvolvido para avaliar o perfil de toxicidade potencial do molecular. Foram coletadas amostras de sangue para isolamentos de soro e PBMC. Populações de células T circulantes foram investigadas após cada dose (Figuras 14E-14H), juntamente com a ativação da subpopulação de células T (CD69+) (Figuras 14A-14D). A porcentagem de células T CD4 e CD8 em circulação foi reduzida com o escalonamento de dose. Ativação de células T CD4 e CD8 foi proeminente a partir de doses de 2,5 µg/kg, sugerindo uma capacidade de ativação potente para as moléculas contendo mAb2 e mAb6. Uma exclusão significativa de células T circulantes foi observada com todas as proteínas a 12,5 µg/kg (Figuras 14I-14L), correlacionando-se novamente com a potência. A depleção de células T circulantes foi bastante transiente, retornando ao nível de pré-tratamento após 24-48 horas (Figuras 14M-14P). O nível sérico de

várias citocinas também foi medido. Liberação significativa de IL-6 e IL-10 foi observada a 12,5 µg/kg com todas as moléculas, que foram bastante transientes, retornando à linha de base às 24 horas (Figura 14U).

[00411] IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} (Figura 14V) e IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid} (Figura 14W) ambas induziram a depleção de células T no sangue em doses mais altas. Da mesma forma, IgG4 CD38_{hhy1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid} (Figura 14X) e IgG4 CD38_{hhy1370}×CD28_{cvn}×CD3_{mid} (Figura 14Y) também induziram a depleção de células T no sangue em doses mais altas. No entanto, células T começaram a reaparecer no sangue 24 horas após tratamento com qualquer uma das quatro proteínas de ligação triespecíficas (Figuras 14Z-14AC). As Figuras 14AD & 14AE mostram a quantidade de IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} ligada a células T CD4+ após a administração de uma dose de 100µg/kg. As Figuras 14AF & 14AG mostram a quantidade de IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} ligada a células T CD8+ após a administração de uma dose de 100µg/kg. Esses dados claramente demonstraram que IgG4 CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} de Ab triespecífico pode se ligar a células T *in vivo* com tempo prolongado (48-72 horas).

Exemplo 7: Otimização de farmacocinética/farmacodinâmica por variantes Fc

Materiais e Métodos

[00412] Fcγ RI humano recombinante marcado por 6-His C-terminal (R&D Systems #1257-FC-050), Fcγ RIIA humano recombinante marcado por 10-His C-terminal (R&D Systems #1330-CD-050/CF) e FcγRIII humano recombinante marcado por HPC4 C-terminal (V158 ou F158) foram capturados em um chip Biacore. Anticorpos a 200, 100 e 50 nM foram injetados por 2 min, seguidos por 2 min de dissociação em HBS-P+, 2mM de tampão de CaCl₂ pH 7,4 a 30µL/min de taxa de vazão

usando Biacore 200. Foi mostrada curva de ligação a 200 nM.

[00413] Ensaio ELISA usando o Receptor Fc Neonatal (FcRn) humano recombinante marcado com HPC4 C-terminal foi usado para medir as propriedades de ligação das proteínas de ligação triespecíficas com diferentes modificações de Fc. Em suma, foi usado o Receptor Fc Neonatal (FcRn) humano recombinante para revestir a placa de ELISA (Nunc 80040LE) (2 µg/ml em PBS) durante a noite. Proteínas de ligação triespecíficas diluídas em série com diferentes modificações de Fc foram adicionadas a cada cavidade e incubadas à temperatura ambiente por uma hora, seguidas por lavagem e incubação com anticorpo secundário de IgG anti-humano marcado com HRP.

Resultados

[00414] Variantes de proteínas de ligação triespecíficas descritas acima foram analisadas a seguir para ligação a vários receptores Fc, a fim de otimizar a farmacocinética (PK)/farmacodinâmica (PD).

[00415] Variantes de Fc humanas foram caracterizadas para ligação a FcγR I (Figura 15A), FcγR IIa (Figura 15B) e FcγR IIIb/c (Figura 15C) como descrito acima. As variantes testadas foram IgG1 humana, IgG4 humana e IgG4 humana com mutações FALA (F234A e L235A de acordo com o índice UE) com uma proteína de ligação triespecífica de controle.

[00416] Como mostrado nas Figuras 15A-15C, IgG1 e IgG4 do tipo selvagem foram capazes de ligar FcγR I e FcγR IIa, mas não FcγR IIIb/c, como relatado anteriormente. Mutações de IgG4 FALA eliminaram a ligação de FcγR I e FcγR IIa. Sem desejar estar vinculado à teoria, acredita-se que eliminar a ligação de FcγR I e FcγR IIa pode melhorar a PK/PD ao remover agrupamentos indesejados através de interações Fc/FcγR.

[00417] Em seguida, a variante IgG4 FALA foi examinada para ligar FcRn. A variante, bem como IgG4 do tipo selvagem, ligou-se a FcRn

(Figura 16). Esses resultados demonstram que as mutações de IgG4 FALA não afetam as interações entre IgG4 Fc e FcRn, implicando um impacto mínimo na meia-vida da proteína de ligação.

[00418] Os parâmetros PK de IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, IgG4 FALA CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, IgG1 LALA P329A CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, e IgG4 FALA CD38_{HHY1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid}, como determinado em camundongos NSG, estão resumidos na Figura 17. As modificações em Fc de IgG4 demonstraram melhorar significativamente a meia-vida e AUC em camundongos NSG eliminando a ligação a FcγRI específico de NSG, que é abundante em macrófagos.

Exemplo 8: Ativação *in vitro* e eficácia antitumoral *in vivo* de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38

Materiais e Métodos

Liberação de citocina de PBMCs humanas

[00419] PMBCs humanas foram incubadas com 100pM de proteínas de ligação por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados e as citocinas foram medidas por Luminex usando placas Drop Array (em triplicata). Para experimentos usando células alvo tumorais, as PMBCs humana foram incubadas com 100pM de anticorpos e com ou sem células alvo RPMI-8226 na proporção 10:1 E:T por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após as PMBCs serem incubadas com proteínas triespecíficas, e foram analisados para citocinas com o kit MILLIPLEX®MAP e analisados em um sistema MAGPIX®.

Ensaio Bcl-xL

[00420] As células T de PBMC (magnéticas) classificadas negativamente foram incubadas com 100 nM de Abs ligados por placa por 1 dia. As células T foram, em seguida, lavadas e machadas com anticorpos conjugados fluorescentemente, específicos para marcadores de células T e Bcl-xL, e analisadas em um citômetro de fluxo.

Proliferação de células T

[00421] As células T de PBMC classificadas negativamente (separação celular por esferas magnéticas) foram incubadas com Abs ligado à placa (100 nM) por 1 a 6 dias. O total de células foi contado por citometria de fluxo usando esferas nos dias específicos após o início da incubação. A alteração de dobra foi calculada a partir das contagens de célula do Dia 0 (500 células/ul). Resultados de 3 doadores de PBMC.

Expressão de IL-2

[00422] Células Jukart IL2-luc2P GloResponse™ foram incubadas com proteínas triespecíficas por 6 horas, em seguida, sistema de ensaio de luciferase Bio-Glo™ foi usado para detectar expressão do gene repórter de luciferase.

Ativação de BMC *in vitro*

[00423] A ativação (CD69+) de células PBMC humanas tratadas com anticorpos triespecíficos anti-CD38xCD28xCD3 ou proteína de ligação a IgG4 de controle foi determinada.

Eficácia *in vivo* em modelo de tumor disseminado

[00424] Para o modelo de camundongo NSG hu-PMBC disseminado, $1-5 \times 10^6$ células foram injetadas em cada camundongo por via intravenosa no dia 0. No dia 3, imagem de luminância da linha de base foi tomada para randomização. No dia 4, 10×10^6 PBMCs humanas de doadores saudáveis foram reconstituídas para cada camundongo por via intraperitoneal (IP). Os camundongos foram tratados semanalmente no dia 5, 12, 19 usando doses indicadas. Imagem corporal por luminância semanal foi obtida nos dias 10, 17, 24 para monitorar o volume tumoral em cada animal. Ao término do estudo, sangue, baço, osso e medula óssea foram coletados para estudo histopatológico.

Resultados

[00425] As proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 contendo mAb2 com a região Fc de variante FALA IgG4

causam níveis marcadamente reduzidos de liberação não específica de IFN- γ em PBMCs humanas, em comparação com proteínas de ligação similares com regiões Fc do tipo selvagem (Figura 18A). Resultados semelhantes foram observados com a liberação de IL-2 (Figura 18B) e TNF- α (Figura 18C). É importante ressaltar que a liberação de citocina foi significativamente menor para essas proteínas de ligação triespecíficas de variantes de Fc do que para o anticorpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referência. Esses resultados implicam um melhor perfil de segurança de proteínas de ligação triespecíficas com variantes Fc devido a uma redução na liberação de citocina não específica.

[00426] Variantes Fc de IgG1 e IgG4 de ambos CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} contendo mAb2 e CD38_{HH71370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} contendo mAb6 também levaram à ativação *in vitro* de PBMCs humanas (Figura 18D).

[00427] Coestimulação imune por ligação de CD28 é necessária para a sobrevivência e proliferação de células T; sinalização de TCR por si só não resulta em proliferação de células T (Sharmee and Allison (2015) Science 348:56-61). A proteína de ligação triespecífica CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} levou à indução de Bcl-xL em ambas as células T CD4+ e CD8+, enquanto a remoção dos domínios de ligação a antígeno CD28 ou CD3 eliminou esse efeito (Figuras 19A e 19B). Esses resultados demonstram, como esperado, que ambos os braços de ligação CD3 e CD28 são necessários para a indução de Bcl-xL em células T pelas proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38, entregando assim um sinal pró-sobrevivência às células T. O braço anti-CD28 da proteína de ligação triespecífica é crítico para a sobreexpressão de Bcl-xL pró-sobrevivência nas células T. Quando comparada com um anticorpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referência, a proteína de ligação triespecífica CD38_{VH1}xCD28xCD3

levou a uma maior sobreexpressão de Bcl-xL em células T CD4⁺ CD8⁺ (Figuras 19C e 19D).

[00428] Para determinar o acionador primário de ativação de células T por proteínas de ligação triespecíficas CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid}, a expressão de IL-2 em linhagem Jurkat repórter de células T Jurkat contendo promotor de IL2 humano acionando o repórter de luciferase foi usada para medir a ativação. Mutações nocaute do domínio de ligação anti-CD3 levou à eliminação de ativação de células T, demonstrando que a ativação de células T é o efeito específico da ligação de CD3 (Figura 19E). Esses resultados mostram que anti-CD3 é o acionador primário de ativação de células T pelas proteínas de ligação triespecíficas, e que anti-CD28 também contribui significativamente para o sinal de ativação de células T. O acionador primário de liberação de citocina também foi examinado usando PBMCs humanas (Figura 19F). Ao examinar a liberação de TNF, IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-10, descobriu-se que CD3 é o determinante primário de liberação de citocina. Descobriu-se que CD28 tem a menor contribuição. Descobriu-se também que proteínas de ligação triespecíficas com anti-CD38_{VH1} induzem menos liberação de citocina do que o comparador de referência.

[00429] A proliferação de células T também foi examinada. A ativação de células T usando proteína de ligação triespecífica anti-CD38×anti-CD28×anti-CD3 com Fc de variante FALA IgG4 levou a uma proliferação maior do que a referência ou controle de isótipo (Figura 19G). Essa ativação foi reduzida mediante mutação dos domínios de ligação a antígeno anti-CD28 ou anti-CD3 (Figura 20).

[00430] O modelo de camundongo NSG humanizado foi usado em seguida para experimentos de crescimento tumoral sólido *in vivo*. Os camundongos foram implantados na semana 6-8 com células de mieloma humano RPMI8226. Na semana 9, PBMCs humanas foram

introduzidas por injeção ip, hPBMCs foram reconstituídas, e terapia antitumoral foi administrada nas semanas 10-13. 56 camundongos NSG fêmeas humanizados com PBMC foram implantados com 5 milhões de células RPMI8226 em 50% de matrigel, e os camundongos foram selecionados e randomizados para o estudo no dia 5 ou 6 pós-implante. Esse modelo serve como um modelo tumoral *in vivo* em camundongos com células T humanas maduras.

[00431] Proteínas de ligação triespecíficas também foram testadas em um modelo de camundongo NSG de crescimento tumoral disseminado, usando células de mieloma humano NCI-H929-Luc e analisando o crescimento tumoral por bioluminescência. Proteína de ligação triespecífica CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} com variante de Fc FALA IgG4 mostrou uma eficácia antitumoral dependente de dose estatisticamente significativa neste modelo tumoral disseminado a 30 µg/kg (Figura 21). A proteína de ligação triespecífica CD38_{Hhy1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid} para a variante de Fc FALA IgG4 também apresentou eficácia antitumoral dependente de dose estatisticamente significativa neste modelo tumoral disseminado a 30 µg/kg e 10 µg/kg (Figura 22).

[00432] Proteínas de ligação triespecíficas de FALA IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} contendo mAb2 e FALA IgG4 CD38_{hhy1370}XCD28_{sup}XCD3_{mid} contendo mAb6 apresentaram atividades potentes de extermínio de tumores *in vitro* contra células de mieloma NCI-H929-Luc usando PBMCs humanas de dois camundongos NSG humanizados doadores (Figuras 23A e 23C). A proteína de ligação triespecífica FALA IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid} apresentou atividade tumoral *in vivo* superior, em comparação com o anticorpo biespecífico de referência, no modelo tumoral disseminado (Figura 23C). Os valores de p de comparação com o controle de veículo (PBS) foram determinados da seguinte forma: FALA IgG4 CD38_{VH1}XCD28_{sup}XCD3_{mid}:

p=0,0023; FALA IgG4 CD38_{HHY1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid}: p=0,0088; Fab-scFv-Fc CD38×CD3 biespecífico de referência: p=0,6045.

[00433] Considerados em conjunto, esses resultados demonstram um melhor candidato anti-CD38 com região Fc variante que apresenta meia-vida aumentada, liberação de citocina não específica reduzida e maior eficácia antitumoral *in vivo*.

Exemplo 9: Caracterização adicional de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38

[00434] Dois sinais são necessários para estimular células T para função efetora ideal e proliferação sustentada. A ativação mediada pelo complexo (TCR)-CD3 de receptor de células T induz ativação transcrricional levando à secreção de citocina. O envolvimento de uma segunda proteína de membrana de superfície, CD28, estimula uma via alternativa de transdução de sinal e inibe a morte celular programada (Esensten JH, Helou YA, et al. Immunity 44:973-88(2016); Hui E, Cheung J, et al. Science 355:1428-1433(2017)). Na ausência de um segundo sinal, a estimulação de células T por CD3 sozinha normalmente leva à morte celular induzida por ativação (Chai JG, Lechler RI. Int Immunol. 9:935-44(1997)). Hipotetizou-se que a proliferação de células T poderia ser aumentada combinando especificidades contra esses dois alvos diferentes.

[00435] A Figura 24A mostra um ensaio de repórter de luciferase que foi conduzido usando células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ (Promega) após estimulação por CD38_{VH1}/CD28_{sup}×CD3_{mid} e seus mutantes KO triplo e KO de sítio de ligação individual e concentração de 10 nM. Esses dados ilustram a contribuição de CD28 para a estimulação de células T (por exemplo, sinalização NFAT).

[00436] Usando o formato de Ab biespecífico duplo variável cruzado (CODV) (Steinmetz A, et al. MAbs 8:867-878(2016)), combinações de Fv's de α-CD3ε (sinal 1) e α-CD28 (sinal 2) foram avaliados para

determinar se o envolvimento duplo dessas moléculas de superfície celular pode estimular e sustentar a ativação de células T (Figura 24B). Um Ab anti-CD3 ϵ de afinidade média ($K_D \sim 20$ nM) foi usado para evitar a estimulação do receptor de células T de alta afinidade que causa liberação de citocina de alto nível e aumenta o risco de síndrome de liberação de citocina. Esse agonista de CD3 foi testado em ambas as posições do braço duplo em combinação com um Ab CD28 superagonista que demonstrou anteriormente suportar a proliferação de células T (Waibler Z, Sender LY, et al. PLoS One 3:e1708(2008)). Esses anticorpos monovalentes bioespecíficos foram incubados com PBMCs humanas *in vitro*, e a estimulação de células T foi medida por secreção de interferon- γ e IL-2. Embora ambas as orientações estivessem ativas, a liberação ideal dessas citocinas foi observada com CD3 na posição proximal e CD28 na posição distal (Figura 24B). Esse braço duplo foi, então, selecionado para o emparelhamento com um anticorpo anti-CD38 no formato de Ab triespecífico (Xu L, Pegu A, et al. Science 358:85–90(2017)).

[00437] A Figura 25 mostra que a sobreexpressão do membro Bcl-xL da família Bcl-2 em células T primárias induzida por CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid} é dependente de CD28. Esses dados ilustram a contribuição de CD28 para a sobrevivência de células T.

[00438] A Figura 26 mostra que o anti-CD28 no Ab triespecífico forneceu sinalização secundária essencial para suportar a proliferação de células T primárias *in vitro*. Esses dados ilustram a contribuição de CD28 para a proliferação da célula T.

[00439] Considerados juntos, esses dados mostram que o anti-CD28_{sup} no anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid} provê funcionalidades significativas na ativação, sobrevivência e proliferação de células T *in vitro*.

[00440] A Figura 27 mostra a configuração do anticorpo triespecífico,

codificada pelo anticorpo de origem. Também é mostrado um modelo de estrutura do Ab triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid} obtido com base em estruturas de cristal de VH1 Fab anti-CD38 e CODV Fab CD28_{sup}/CD3_{sup}/CD3_{mid} (direita).

[00441] As Figuras 28A e 28B mostram que células de mieloma múltiplo (MM) com alta (RPMI-8226; Figura 28A) e baixa (KMS-11; Figura 28B) expressão de superfície de CD38 foram lisadas de forma eficiente por PBMCs humanas (E:T=10:1) incubadas com várias concentrações do Ab triespecífico. A contribuição para a atividade de extermínio por cada sítio de ligação foi demonstrada por mutações KO de sítio de ligação. Esses dados demonstram que o anticorpo triespecífico CD38 lisou células MM humanas através do reconhecimento de ambos CD38 e CD28. O CD28 expresso em células de mieloma múltiplo forneceu um alvo secundário pelo anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}_FALA, aumentando significativamente sua atividade de extermínio.

[00442] As Figuras 29A-29C mostram que o mutante anti-CD28_{sup}KO do Ab triespecífico apresentou atividade antitumoral marcadamente reduzida contra células MM CD38_{high}, CD38_{mid} e CD38_{low} *in vitro*. São mostrados ensaios usando células RPMI-8226 (Figura 29A), U266 (Figura 29B) ou KMS-11 (Figura 29C). A expressão de CD28 em células MM aumentou sua suscetibilidade à citólise mediada pelo anticorpo triespecífico CD38.

[00443] A Figura 30 mostra os resultados de um estudo de eficácia *in vivo* em um modelo de linhagem celular de mieloma múltiplo humano disseminado usando um camundongo NSG reconstituído com células T primárias humanas amplificadas *in vitro*. A redução de carga tumoral em grupos de tratamento com anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}_FALA foi dependente de dose e estatisticamente diferente. Assim, o anticorpo triespecífico CD38

conferiu proteção contra o crescimento de tumor de células MM humanas disseminado *in vivo*.

[00444] Um estudo microscópico ainda demonstrou o extermínio de células de câncer por células T humanas primárias mediado pelo anticorpo triespecífico *in vitro*. As Figuras 31A e 31B mostram imagens microscópicas demonstrando RPMI-8226 (células MM humanas, rotuladas com corante CellTracker Deep Red) lisadas por PBMCs humanas mediadas por anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}_FALA. A Figura 31A mostra o controle, enquanto a Figura 31B mostra a lise mediada por anticorpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup}xCD3_{mid}_FALA. A proporção 10:1 E:T foi usada com incubação por 24 horas. A exposição a Ab de controle de mutante nulo triplo induziu alterações mínimas na viabilidade de células tumorais ao longo de 24 horas (Figura 31A). Em contrapartida, a incubação com o Ab triespecífico CD38 ativo induziu agrupamento substancial de células T ao redor de células tumorais, levando à sua lise quase completa (Figura 31B). Esses dados demonstram que anticorpo triespecífico CD38/CD3xCD28 mediou a citólise de células de mieloma por células T.

Exemplo 10: Modificação de sítios de ligação a receptor Fc na região Fc de IgG4 de proteínas de ligação triespecíficas anti-CD38 reduz inflamação não específica

[00445] A região Fc de anticorpos se liga a receptores celulares em monócitos e células NK que induzem inflamação não específica, o que poderia predispor os indivíduos do tratamento à síndrome de liberação de citocina. O papel dos receptores Fc na estimulação da liberação de citocina foi examinado por testes de mutantes que eliminaram a ligação de Fc γ I, Fc γ IIa, b e Fc γ III. Para esse fim, um isótipo de IgG4 que não fixa o complemento foi usado.

[00446] A ligação no ensaio de ressonância de plasmons de

superfície (SPR) usando o sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ) foi usada para medir a afinidade das variantes Fc de IgG4 especificadas para receptores Fc humanos indicados imobilizados no chip. Variantes Fc de IgG4 foram usadas a 150 nM. A ligação a FcRn humano foi realizada usando ELISA por revestimento do antígeno de FcRn humano na placa.

[00447] Uma mutação ("FALA") na região Fc que foi descrita anteriormente (Alegre ML, Peterson LJ, et al. Transplantation 57:1537-43(1994); ver também Exemplos 7-9) eliminou a ligação a todos os receptores Fc (Figuras 32 e 33). Quando testado para liberação não específica de citocina, anulou a liberação de IFN- γ em PBMC não estimulada, permitindo a estimulação máxima na presença de alvos tumorais que expressaram CD38 (Figura 34, esquerda vs. direita, FALA). Esse mutante Fc reteve sua atividade citolítica nos alvos tumorais de mieloma comparáveis ao controle Fc de tipo selvagem em células expressando diferentes níveis de CD38 (Figura 35). Da mesma forma, outra região Fc de IgG4 mutada ("PVA", ver Figura 32) que eliminou a ligação a receptores Fc (Figura 33) também anulou a liberação de IFN- γ em PBMC não estimulada, permitindo a estimulação máxima na presença de alvos tumorais que expressaram CD38 (Figura 34, esquerda vs. direita, PVA) e manteve sua atividade citolítica nos alvos tumorais de mieloma comparáveis ao controle Fc do tipo selvagem em células expressando diferentes níveis de CD38 (Figura 35).

Exemplo 11: Contribuição de anti-CD38 e anti-CD28 para a atividade citolítica de proteínas de ligação triespecíficas

[00448] Mutantes de Ab triespecíficos para cada sítio de ligação ou combinação de sítios de ligação foram gerados e testados quanto à sua atividade citolítica contra linhagens celulares de mieloma múltiplo com alta (RPMI-8226) ou baixa (KMS-11) expressão de superfície de CD38 e CD28.

[00449] Como mostrado acima nas Figuras 28A e 28B, a mutação de ligação específica de CD3 anulou a citólise, enquanto mutações nulas anti-CD38 e CD28 reduziram significativamente o extermínio, mas alguma função residual foi mantida, indicando que ambos os anti-CD38 e CD28 contribuíram para o extermínio de células tumorais.

[00450] Em comparação com daratumumab (o anticorpo monoclonal α -CD38 aprovado para o tratamento de mieloma múltiplo; ver McKeage K. *Drugs*. 76:275-81(2016)), o Ab triespecífico mostrou notável potência de extermínio de 3-4 log *in vitro* em relação a diferentes linhagens de células expressando CD38, incluindo células de mieloma múltiplo CD38^{high} e CD38^{low} (Figura 36).

Exemplo 12: Ab CD38/CD3xCD28 estimula CD4 e CD8 de memória central, Th1 e respostas específicas de antígeno

[00451] Para determinar se Ab triespecífico CD38/CD3xCD28 poderia melhorar a função imune celular, o fenótipo de células T expandidas *in vitro* foi avaliado.

Materiais e Métodos

[00452] Células mononucleares de sangue periférico foram isoladas do sangue de doadores humanos saudáveis coletados por Research Blood Components, LLC (Boston, MA). As PBMCs foram adicionadas a placas revestidas com anticorpo (350 ng/cavidade) (5×10^5 células/ml), como descrito anteriormente acima, e incubadas a 37°C por 3 e 7 dias. As células foram coletadas em momentos específicos e analisadas por citometria de fluxo para subconjuntos de células T: sem tratamento (CCR7⁺ CD45RO⁻), T_{cm} (CCR7⁺ CD45RO⁺), T_{em} (CCR7⁻ CD45RO⁺), Tregs (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25^{hi}). As células foram também tratadas com monensina (GolgiStop) (BD Biosciences, CA) por pelo menos 6 horas antes da coloração de fluxo para determinar a expressão de citocina intracelular: Th1 (CD4 + IFN- γ), Th2 (CD4 + IL-4) e Th17 (CD4 + IL-17). Células T CD8⁺ específicas de CMV pp65 foram detectadas

usando pentâmero conjugado fluorescente restrito a HLA de doadores de PBMC (A*02:01/NLVPMVATV) (ProImmune, Oxford, Reino Unido). A PBMC foi obtida de HemaCare (Van Nuys, CA) de doadores com populações positivas para CMV conhecidas e tipos de HLA. A PMBC de doadores negativos para o tipo de HLA restritivo foi usada como controle negativo. A coloração foi realizada como o protocolo do fabricante.

Resultados

[00453] PBMCs humanas foram incubadas por 7 dias com um Ab triespecífico ou controle negativo mutante triplo na ausência de citocinas. A análise dos subconjuntos de CD4 revelou a maior proliferação no conjunto de memória central, com um aumento menor nas células efectoras de memória (Figura 37A). A análise do subconjunto de CD4 também revelou a maior proliferação de células Th1 (>6 vezes) em comparação com células Th2 ou Th17 (Figura 37B). No subconjunto de CD8, houve um aumento de >150 vezes no subconjunto de CD8 de memória central no dia 7, com um aumento menor nas células efectoras de memória (Figura 37C). É importante ressaltar que respostas de CD8 específicas de antígeno preexistentes a CMV, direcionadas ao epítipo pp65 em doadores soropositivos para HLA-A2, usando coloração por tetrâmero (Gratama JW, van Esser JW, et al. Blood 98:1358-1364(2001)), aumentaram >44 vezes na presença do triespecífico CD38 em comparação com o controle negativo (Figura 37D).

[00454] Tomados em conjunto, esses dados indicam que Ab triespecífico de CD38 estimula a função Th1 específica e as respostas protetoras de células T de memória CD8 que provavelmente aumentam a imunidade antitumoral *in vivo*.

Exemplo 13: CD28 em células de mieloma múltiplo aumenta reconhecimento e citólise de células T

Materiais e Métodos

Citometria de fluxo

[00455] Os níveis de CD28 e CD38 nas linhagens celulares tumorais indicadas foram determinados por citometria de fluxo usando o kit QIFI (Dako, Dinamarca, cat. #K007811) como descrito (S4). Em suma, CD38 anti-humano de camundongo (clone AT13/5, IgG1 de camundongo, Santa Cruz Biotech, cat # 59028) e CD28 anti-humano (clone CD28.2, IgG1 de camundongo, k, BioLegend, cat # 3029123) foram usados como anticorpos primários (a 10 µg/ml) para a detecção de CD38 e CD28 de superfície em linhagens celulares usando o protocolo do fabricante. As densidades de superfície foram calculadas usando os padrões de calibração do kit QIFI e a formulação fornecida pelo kit.

Geração de linhagens celulares de mieloma múltiplo humano KO CD28 usando nocaute mediado por CRISPR

[00456] Para a linhagem celular KMS-11, o nocaute de CD28 foi executado usando o kit de nocaute humano de CD28 CRISPR (Origene). O kit contém um vetor doador com um cassete funcional de GFP-puromicina e dois vetores Cas-9 distintos, cada um com RNA guia predefinido diferente (gRNA 1: TACCTGTTACTTGAATTGAA (SEQ ID NO: 117) e gRNA 2: ATTTTGTGAGGTCTTCCAAT (SEQ ID NO: 118) direcionado a exon 1 e íntron 1 de CD28, respectivamente). As células foram semeadas em uma placa de 6 cavidades em uma densidade de $3,10^5$ células/cavidade em Meio RPMI 1640 GlutaMAX suplementado com 10% de FBS e co-transfectado após 24 horas com todos os três segundos usando Reagente de Transfecção Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher Scientific) com as instruções do fabricante. Puromicina foi adicionada 48 horas após a transfecção em uma concentração final de 0,5 µg/ml. A eficiência de transfecção foi de 30% quando usando 6,25 µl/cavidade de Lipofectamine™ 3000, 1,25 µg de cada vetor Cas-9/gRNA e 2,5 µg do vetor doador de GFP-puromicina. Nocaute de CD28 na linhagem celular RPMI 8226 foi executado usando o conjunto de lentivírus All-in-One de CD28 sgRNA CRISPR (Applied Biological

Materiais Inc.). Consiste em um conjunto de 3 vetores all-in-one lentivirais que expressam o gene Cas9, um gene de resistência à Puromicina e um sgRNA diferente (sgRNA 1: ATTGTCGTACGCTACAAGCA (SEQ ID NO: 119) direcionado a exon 2 de CD28 e sgRNA 2: CAAAAGGGCTTAGAAGGTCC (SEQ ID NO: 120) e sgRNA 3: CTATAGCTTGCTAGTAACAG (SEQ ID NO: 121) direcionados a exon 3 de CD28). As células foram infectadas usando um protocolo de espinoculação com $2 \cdot 10^5$ células misturadas com partículas lentivirais (10UI/célula), 8 µg/ml de polibeno e 1:100 Intensificador de Transdução ViralPlus (Applied Biological Materials Inc.). A mistura foi pré-incubada por 20 minutos em temperatura ambiente, em seguida, centrifugada por 30 minutos a 32°C e 800 × g e semeada em placa de 12 cavidades. Puromicina foi adicionada 48 horas após a infecção em uma concentração final de 0,25 µg/ml. Ambas as linhagens celulares foram passadas pelo menos 5 vezes (ou até a viabilidade celular se tornar estável) antes de confirmar o knockdown de CD28 no nível de proteína por citometria de fluxo (anticorpo CD28 PE Clone 28,2- BioLegend). As células CD28 negativas foram, então, classificadas em um classificador de células Sony SH800S e cultivadas em meio suplementado com 0,25 µg/ml ou 0,5 µg/ml de puromicina, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (ThermoFisher Scientific). As células foram, então, clonadas por diluição limitante e nocaute de CD28 foi validado por citometria de fluxo e por PCR e sequenciamento de Sanger usando os iniciadores dianteiros e reversos listados abaixo.

Tabela R. Lista de iniciadores dianteiros e reversos.

Linhagem Celular	Amplicon	Iniciadores	Tamanho de Amplicon	Comentários
KMS-11	CD28_GFP_left	F: CACAACTGTCCCCA TCCTATGAA (SEQ ID NO: 122) R: AAGCTGCCATCCAGA TCGTTATCG (SEQ ID NO: 123)	1475 bp	Valida a inserção do cassete GFP-puromicina (lado esquerdo)
	CD28_PUR O_right	F: CCAAATTAAGGGCCA GCTCATTCC (SEQ ID NO: 124) R: ACCTGTACATCCTTG GGCAAATCC (SEQ ID NO: 125)	1233 bp	Valida a inserção do cassete GFP-puromicina (lado direito)
	CD28_Exon_1	F: GTCAGGATGCCTTGT GGTTTGAGT (SEQ ID NO: 126) R: CAGAGCTTCCAGAG CCAATCTAC (SEQ ID NO: 127)	Variável; WT=720	Região circundante à junção exon1-ínton1 de CD28 correspondente ao sítio de inserção do cassete GFP-puromicina e/ou indels após clivagem de CRISPR
RPMI 8226	Exon_2	F: CCATGTACTGCCTTC TGGGTGAAA (SEQ ID NO: 128) R: CCACTGACCACAACC CAGTTTT (SEQ ID NO: 129)	Variável; WT=682 bp	Região circundante ao éxon 2 de CD28 correspondente a sítios de clivagem de CRISPR
	Exon_3	F: AGGCCATTGGAAGTC ACCGTTT (SEQ ID NO: 130) R: GCCAACATTGTCCAT TGGCTTCAG (SEQ ID NO: 131)	Variável; WT=816 bp	Região circundante ao éxon 3 de CD28 correspondente a sítios de clivagem de CRISPR

Resultados

[00457] O CD28 foi incorporado ao Ab triespecífico para melhorar a

proliferação e sobrevivência de células T; no entanto, quando os marcadores de superfície celular foram avaliados em células de mieloma múltiplo, foi encontrada uma maioria de linhagens celulares (>95%) que expressam a glicoproteína CD28 (Tabela S).

Tabela S. Expressão de superfície celular de CD28 e CD38 em linhagens celulares de mieloma múltiplo humano.

Linhagem celular	CD28	CD38
JJN3	1.040	50
KMS-11 (p17)	35.345	2.845
U266	170.525	13.825
L-363	9.145	17.500
MM.1S	56.560	44.535
MM.1R	66.220	49.160
KMS-12BM	0	62.845
RPMI 8226	83.915	136.255
NCI-H929	22.065	153.620
LP-1	7.420	372.835
U266-CD38++	126.465	633.805
JJN3-CD38	0	714.805
MOLP-8	245	885.030
NCI-H929-CD38++	22.935	981310
RPMI 8226-CD38++	86.320	1419.120

[00458] Foi relatado que a expressão de CD28, embora ausente em células plasmáticas normais (Almeida J, et al. British J. of Haematol. 107:121-131(1999)), pode ser detectada em células plasmáticas de mieloma primário em aproximadamente um terço de pacientes recém-diagnosticados (Mateo G, et al. Clin. Cancer Res. 11:3661–3667(2005)). Além disso, aumenta a frequência durante a progressão do mieloma e se correlaciona com mau prognóstico e características agressivas do mieloma (Robillard N, Jego G, et al. Clin Cancer Res. 4:1521-6(1998); Nair JR, Carlson LM, et al. J. Immunol. 187:1243-53(2011)).

[00459] Para determinar se a expressão de CD28 em células alvo poderia melhorar o reconhecimento e lise de células T, a atividade da Abs triespecíficos do tipo selvagem vs. nulos CD28 em três linhagens independentes de mieloma com diferentes graus de expressão de CD38 e CD28 foi comparada. Como observado acima no Exemplo 9 e mostrado nas Figuras 29A-29C, a citólise foi observada em todas as três linhagens, independentemente do nível de expressão de CD28 pelo Ab triespecífico CD38; no entanto, em todas as linhagens celulares, a atividade citolítica do Ab específico nulo CD28 foi reduzida em 30-100 vezes, com a diminuição mais substancial na linhagem celular KMS-11, que apresentou a menor expressão de CD38 (cf. WT vs. Δ CD28, Figura 29C vs. Figura 29A ou Figura 29B).

[00460] A contribuição de CD28 para reconhecimento e lise de células tumorais foi ainda confirmada usando o nocaute de CD28 mediado por CRISPR na célula alvo de mieloma. A expressão de CD28 foi indetectável em células KMS-11 CD28KO em comparação com a linhagem parental (Figura 38, painel superior, direita vs. esquerda). A sensibilidade das células KMS-11 CD28KO à citólise de células T foi concomitantemente reduzida em 10-100 vezes (Figura 38, painel inferior, esquerda). Consistente com esse efeito, não foi observada diferença na citólise com triespecífico de CD38 em comparação com o triespecífico mutante nulo CD28 nas células alvo KO de CD38 (Figura 38, painel inferior, direita).

Exemplo 14: Citólise do Ab triespecífico CD38 contra linhagens celulares de câncer hematológico CD 38+

[00461] Os exemplos acima demonstram anticorpos anti-CD38/CD3/CD28 triespecíficos que promovem a citólise de múltiplas células de mieloma. A capacidade desses anticorpos para promover a citólise de outras linhagens celulares de câncer foi testada.

[00462] Como mostrado na Figura 39, Ab mutante FALA triespecífico

CD38/CD28xCD3 possui atividade citolítica direcionada a linhagens CD38⁺CD28⁻, incluindo leucemia mielocítica aguda (AML(KG-1)), um linfoma de células B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL (KOPN8)) e linfoma linfocítico crônico (CLL(Z-138)). Isso demonstra que anticorpos anti-CD38/CD3/CD28 triespecíficos possuem atividade contra outras linhagens celulares de câncer hematológico CD38⁺, incluindo aquelas que são CD28⁻.

Exemplo 15: A ativação *in vitro* de PBMC humana por superagonista α -CD28 requer bivalência do anticorpo

[00463] A ativação *in vitro* de PBMC humana por TGN1412 (TGN), braço de ligação único TGN1412 (TGNslg) e braço de ligação único anti-CD28_{sup} (CD28_{sup}slg) foi realizada como descrito (Findlay L, Eastwood D, et al. J Immunol Methods 352:1-12 (2010)). 10⁵ PBMCs humanas foram semeadas em placas de 96 cavidades de polipropileno revestidas a seco com anticorpos indicados (1 ug/cavidade) por 24 horas, como descrito anteriormente. Citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL2 no sobrenadante foram medidas por Luminex como descrito no Exemplo 8.

[00464] A inclusão de uma única especificidade do superagonista de CD28 também reduziu a liberação não específica de citocina observada com o mAb superagonista de CD28 (Figura 40) anteriormente associada a seus efeitos adversos como uma IgG nativa em seres humanos (Suntharalingam G, Perry MR, et al, N. Engl J. Med. 355:1018-1028(2006)). Em vez disso, a coestimulação pelo Ab triespecífico aumentou a potência e a sobrevivência de células T que lisam e protegem contra tumores. O mais interessante é que o Ab triespecífico de CD38 preferencialmente amplifica populações de células Th1 e Tcm *in vitro*, exibindo uma característica importante que difere dos Abs monoclonais de agonista α -CD3 ou superagonista α -CD28 usados para propagar Treg para induzir tolerância (Penaranda C1, Tang Q, Bluestone JA. J Immunol. 187:2015-22.(2011); Tabares P, Berr S, et al.

Eur J Immunol. 44:1225-36(2014)).

[00465] Tomados em conjunto, os dados apresentados nos Exemplos 1-15 demonstram anticorpos anti-CD38/CD3/CD28 triespecíficos que estimulam uma imunidade antitumoral potente ao envolver dois receptores de sinalização de células T e melhorar o reconhecimento de células alvo. A ligação de CD3 e CD28 desencadeou a sinalização do receptor de células T que sobrerregulou Bcl-xl e inibiu a apoptose de células T, aumentando a função efetora e a sobrevivência de células T. O terceiro braço do Ab triespecífico interagiu com CD38, que é altamente expresso em células de mieloma múltiplo. Coincidentemente, CD28 também é expresso em células da maioria dos mielomas; portanto, o Ab triespecífico melhorou o direcionamento, ao mesmo tempo, melhorou a ativação de células T e citólise. O anticorpo triespecífico otimizado anticorpo lisou células de mieloma de forma >1000 vezes eficaz do que daratumumab, um terapêutico de mAb anti-CD38, e apresentou atividade antitumoral potente *in vivo* em um modelo de camundongo humanizado.

[00466] Embora a descrição inclua várias modalidades, entende-se que variações e modificações ocorrerão para os versados na técnica. Portanto, pretende-se que as reivindicações anexas abranjam todas essas variações equivalentes que se enquadram no escopo da descrição. Além disso, os títulos das seções usados neste documento são apenas para fins organizacionais, e são não considerados limitantes do objeto descrito.

[00467] Cada modalidade descrita neste documento pode ser combinada com qualquer outra modalidade ou modalidades, a menos que seja claramente indicado o contrário. Em particular, qualquer característica ou modalidade indicada como preferida ou vantajosa pode ser combinada com qualquer outra característica/características ou modalidade/modalidades indicada como preferida ou vantajosa, a

menos que seja claramente indicado o contrário.

[00468] Todas as referências citadas neste pedido são expressamente incorporadas por referência neste documento.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de ligação compreendendo um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e

(b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

2. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e

(b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID

NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

3. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 87), ou QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); em que FR2 compreende a sequência MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) ou MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); em que FR3 compreende a sequência NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 93) ou NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSED TAVYFC (SEQ ID NO: 94); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 96).

4. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6.

5. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 8.

6. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18.

7. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 6,

caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 19 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20.

8. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18.

9. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 22 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20.

10. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18.

11. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 20.

12. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); e

(b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

13. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 12, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência, do terminal N ao terminal C, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; em que FR1 compreende a sequência QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCAS (SEQ ID NO: 87), ou QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); em que FR2 compreende a sequência MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) ou MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); em que FR3 compreende a sequência NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 93) ou NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFC (SEQ ID NO: 94); e em que FR4 compreende a sequência WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 96).

14. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 1 ou 12, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

15. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 15 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 16.

16. Proteína de ligação compreendendo um sítio de ligação

a antígeno que liga um polipeptídeo CD38, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno compreende:

(a) um domínio variável de cadeia pesada de anticorpo (VH) compreendendo uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43); e

(b) um domínio variável de cadeia leve de anticorpo (VL) compreendendo uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

17. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que o domínio VH compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio VL compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

18. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma cadeia pesada de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 11 e uma cadeia leve de anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 12.

19. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo.

20. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno liga um

polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1.

21. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 2,1 nM ou menos.

22. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 de isoforma E humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 105.

23. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30.

24. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o sítio de ligação a antígeno liga o polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30 com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de 1,3 nM ou menos.

25. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é um anticorpo quimérico ou humanizado.

26. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 24, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é um anticorpo humano.

27. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é um anticorpo monoclonal.

28. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende uma ou mais cadeias pesada de anticorpo de comprimento total compreendendo uma região Fc.

29. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a região Fc é uma região Fc humana compreendendo uma ou mais mutações que reduzem ou eliminam função efectora e/ou ligação a receptor Fc da região Fc.

30. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a região Fc é uma região Fc de IgG1 humana.

31. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a região Fc de IgG1 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A.

32. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que a região Fc de IgG1 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S.

33. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que a região Fc é uma região Fc de IgG4 humana.

34. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K.

35. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que a região Fc de IgG4 humana

compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são F234A e L235A.

36. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizada pelo fato de que a região Fc de IgG4 humana compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236.

37. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende um fragmento F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv ou scFv de anticorpo.

38. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 34, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é conjugada a um rótulo ou agente citotóxico.

39. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é uma proteína de ligação biespecífica compreendendo o primeiro sítio de ligação a antígeno que liga o polipeptídeo CD38 e um segundo sítio de ligação a antígeno.

40. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo o primeiro sítio de ligação a antígeno que liga o polipeptídeo CD38, um segundo sítio de ligação a antígeno, e um terceiro sítio de ligação a antígeno.

41. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o primeiro sítio de ligação a antígeno liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, e em que o

segundo e terceiro sítios de ligação a antígeno ligam, cada um, uma proteína de superfície de célula T.

42. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo fato de que o primeiro sítio de ligação a antígeno liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano, e em que (a) o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 humano, e o terceiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 humano, ou (b) o segundo sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD3 humano, e o terceiro sítio de ligação a antígeno liga um polipeptídeo CD28 humano.

43. Proteína de ligação compreendendo três sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma ou mais proteínas alvo, caracterizada pelo fato de que pelo menos um dos três sítios de ligação a antígeno reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo.

44. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação reage de maneira cruzada com um polipeptídeo CD38 humano compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 105.

45. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação reage de maneira cruzada com um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 30.

46. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 45, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo e dois sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma

proteína de superfície de célula T.

47. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 46, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que reage de maneira cruzada com um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano e um domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 de macaco cinomolgo, um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD28 humano, e um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD3 humano.

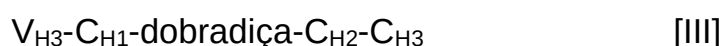
48. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 47, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada, e

em que:

(a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO:

35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(b) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou

(c) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31) ou GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32) ou IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34) ou QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35) ou GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

49. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48,

caracterizada pelo fato de que

(a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(b) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(c) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ

ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(d) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36);

(e) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou

(h) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-

H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

50. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de que

(a) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSFN (SEQ ID NO: 31), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGNGGT (SEQ ID NO: 32), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO: 34), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de LAS (SEQ ID NO: 35), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36); ou

(b) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de GAS (SEQ ID NO: 40), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de QQNKEDPWT (SEQ ID

NO: 36).

51. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que

(a) o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 5, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 6;

(b) o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 17, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18;

(c) o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 21, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18;

(d) o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 23, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 18; ou

(e) o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14.

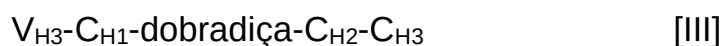
52. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 43 a 47, caracterizada pelo fato de que a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada, e

em que:

(a) o domínio V_{H1} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L1} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46);

(b) o domínio V_{H2} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L2} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46); ou

(c) o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de

aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

53. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que o domínio V_{H3} compreende uma sequência CDR-H1 compreendendo a sequência de aminoácido de GFTFSSYG (SEQ ID NO: 41), uma sequência CDR-H2 compreendendo a sequência de aminoácido de IWYDGSNK (SEQ ID NO: 42), e uma sequência CDR-H3 compreendendo a sequência de aminoácido de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO: 43), e o domínio V_{L3} compreende uma sequência CDR-L1 compreendendo a sequência de aminoácido de QGIRND (SEQ ID NO: 44), uma sequência CDR-L2 compreendendo a sequência de aminoácido de AAS (SEQ ID NO: 45), e uma sequência CDR-L3 compreendendo a sequência de aminoácido de LQDYIYYPT (SEQ ID NO: 46).

54. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

55. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 54, caracterizada pelo fato de que

(a) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54;

(b) o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54;

(c) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54;

(d) o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54;

(e) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85;

(f) o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85;

(g) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85; ou

(h) o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 52, o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 84, e o domínio V_{L1} compreende a

sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 85.

56. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que

(a) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 13, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 14; ou

(b) o domínio V_{H1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, o domínio V_{L1} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 50, o domínio V_{H2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 53, o domínio V_{L2} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 54, o domínio V_{H3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 9, e o domínio V_{L3} compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

57. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 56, caracterizada pelo fato de que pelo menos um de L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 tem independentemente 0 aminoácidos de comprimento.

58. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 56, caracterizada pelo fato de que L_1 , L_2 , L_3 ou L_4 têm, cada um independentemente, pelo menos um aminoácido de comprimento.

59. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 56, caracterizada pelo fato de que (a) L_1 , L_2 , L_3 e L_4 , cada um independentemente, têm zero aminoácido de comprimento ou compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID

NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59); ou (b) L₁, L₂, L₃ e L₄, cada um independentemente, compreendem uma sequência selecionada do grupo que consiste em GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), e GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59).

60. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 56, caracterizada pelo fato de que

(a) L₁ compreende a sequência GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ compreende a sequência TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ compreende a sequência S, e L₄ compreende a sequência RT;

(b) L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ compreende a sequência GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ tem 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento;

(c) L₁ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ compreende a sequência GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ tem 0 aminoácidos de comprimento, e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento; ou

(d) L₁ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ tem 0 aminoácidos de comprimento, L₃ compreende a sequência GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), e L₄ tem 0 aminoácido de comprimento.

61. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 60, caracterizada pelo fato de que os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça-C_{H2}-C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234 e 235 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de

aminoácido são F234A e L235A.

62. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 60, caracterizada pelo fato de que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236.

63. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 62, caracterizada pelo fato de que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 228 e 409 de IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S228P e R409K.

64. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 60, caracterizada pelo fato de que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 234, 235 e 329 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são L234A, L235A e P329A.

65. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 60, caracterizada pelo fato de que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de

aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S.

66. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 65, caracterizada pelo fato de que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V; e em que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da terceira cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W.

67. Proteína de ligação, de acordo com qualquer uma das reivindicações 48 a 65, caracterizada pelo fato de que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 354 e 366 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S354C e T366W; e em que o domínio dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da terceira cadeia de polipeptídeo compreende substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 349, 366, 368 e 407 de IgG1 ou IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são Y349C, T366S, L368A e Y407V.

68. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência

de aminoácido de SEQ ID NO: 62, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63.

69. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 65, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63.

70. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 67, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 63.

71. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 60, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 68, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

72. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 64, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 70, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

73. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 48 ou 52, caracterizada pelo fato de que a primeira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 61, a segunda cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 66, a terceira cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 71, e a quarta cadeia de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 69.

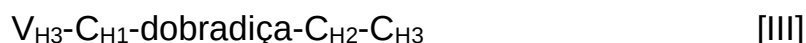
74. Proteína de ligação, caracterizada pelo fato de que compreende três sítios de ligação a antígeno que ligam, cada um, uma ou mais proteínas alvo, em que a proteína de ligação compreende quatro cadeias de polipeptídeo que formam os três sítios de ligação a antígeno, em que uma primeira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma segunda cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma terceira cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



e uma quarta cadeia de polipeptídeo compreende uma estrutura representada pela fórmula:



em que:

V_{L1} é um primeiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L2} é um segundo domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{L3} é um terceiro domínio variável de cadeia leve de imunoglobulina;

V_{H1} é um primeiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H2} é um segundo domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

V_{H3} é um terceiro domínio variável de cadeia pesada de imunoglobulina;

C_L é um domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina;

C_{H1} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H1} de imunoglobulina;

C_{H2} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H2} de imunoglobulina;

C_{H3} é um domínio constante de cadeia pesada C_{H3} de imunoglobulina;

dobradiça é uma região de dobradiça de imunoglobulina conectando os domínios C_{H1} e C_{H2} ; e

L_1 , L_2 , L_3 e L_4 são ligantes de aminoácido;

em que o polipeptídeo de fórmula I e o polipeptídeo de fórmula II formam um par cruzado de cadeia leve-cadeia pesada; e

em que:

(a) os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} de IgG1 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 298, 299 e 300 de IgG1 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são S298N, T299A e Y300S; ou

(b) os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} da segunda e terceira cadeias de polipeptídeo são domínios C_{H3} de IgG4 humana, e em que os domínios dobradiça- C_{H2} - C_{H3} compreendem, cada um, substituições de aminoácido em posições correspondentes às posições 233-236 de

IgG4 humana de acordo com o índice UE, em que as substituições de aminoácido são E233P, F234V, L235A, e uma exclusão em 236.

75. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que pelo menos um par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38.

76. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que um, dois ou três pares de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} formam um sítio de ligação a antígeno que liga um alvo de antígeno selecionado do grupo que consiste em A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG,IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM e XCR1.

77. Proteína de ligação, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que um primeiro par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD3 humano, um segundo par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD28 humano, e um terceiro par de V_{H1} e V_{L1} , V_{H2} e V_{L2} , e V_{H3} e V_{L3} forma um sítio de ligação a antígeno que liga um alvo de antígeno humano selecionado do grupo que consiste em A2AR, APRIL, ATPDase, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4, B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL15, CCL17, CCL19, CCL20, CCL21, CCL24, CCL25, CCL26, CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23, CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80, CD86, CD122, CD137, CD137L, CD152, CD154, CD160, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD278, CD279, CDH1, quitinase, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1, CSF-2, CSF-3, CX3CL1, CXCL12, CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GITR, GITRL, GM-CSF, Her2, HHLA2, HMGB1, HVEM, ICOSLG,IDO, IFN α , IgE, IGF1R, IL2Rbeta, IL1, IL1A, IL1B, IL1F10, IL2, IL4, IL4Ra, IL5, IL5R, IL6, IL7, IL7Ra, IL8, IL9, IL9R, IL10, rhIL10, IL12, IL13, IL13Ra1, IL13Ra2, IL15, IL17, IL17Rb, IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4, ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, MHC classe II, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SISP1, SLC, SPG64, ST2, STEAP2, Syk quinase, TACI, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP, TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM e XCR1.

78. Kit de polinucleotídeos, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 74, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75;

(b) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 77, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75;

(c) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 79, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 75;

(d) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 72, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 80, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81;

(e) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 76, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 82, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81; ou

(f) um primeiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 73, um segundo polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 78, um terceiro polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 83, e um quarto polinucleotídeo compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 81.

79. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que codifica a proteína de ligação, como definida qualquer uma das reivindicações 1 a 77.

80. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 79.

81. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o kit de polinucleotídeos, como definido na reivindicação 78, o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 79, ou o vetor, como definido na reivindicação 80.

82. Método de produzir uma proteína de ligação, o método caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira, como definida na reivindicação 81, tal que a proteína de ligação seja produzida.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que ainda compreendendo recuperar a proteína de ligação da célula hospedeira.

84. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de ligação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 77, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

85. Método de prevenir e/ou tratar câncer em um paciente, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao paciente uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma proteína de ligação, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 73, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 84.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a proteína de ligação compreende um sítio de ligação a antígeno que liga uma proteína de superfície de célula T e outro sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado

pelo fato de que a proteína de ligação é uma proteína de ligação triespecífica compreendendo um primeiro sítio de ligação a antígeno que liga CD3, um segundo sítio de ligação a antígeno que liga CD28, e um terceiro sítio de ligação a antígeno que liga o domínio extracelular de um polipeptídeo CD38 humano.

88. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 87, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma proteína de ligação é coadministrada com um agente quimioterápico.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 88, caracterizado pelo fato de que o câncer é mieloma múltiplo.

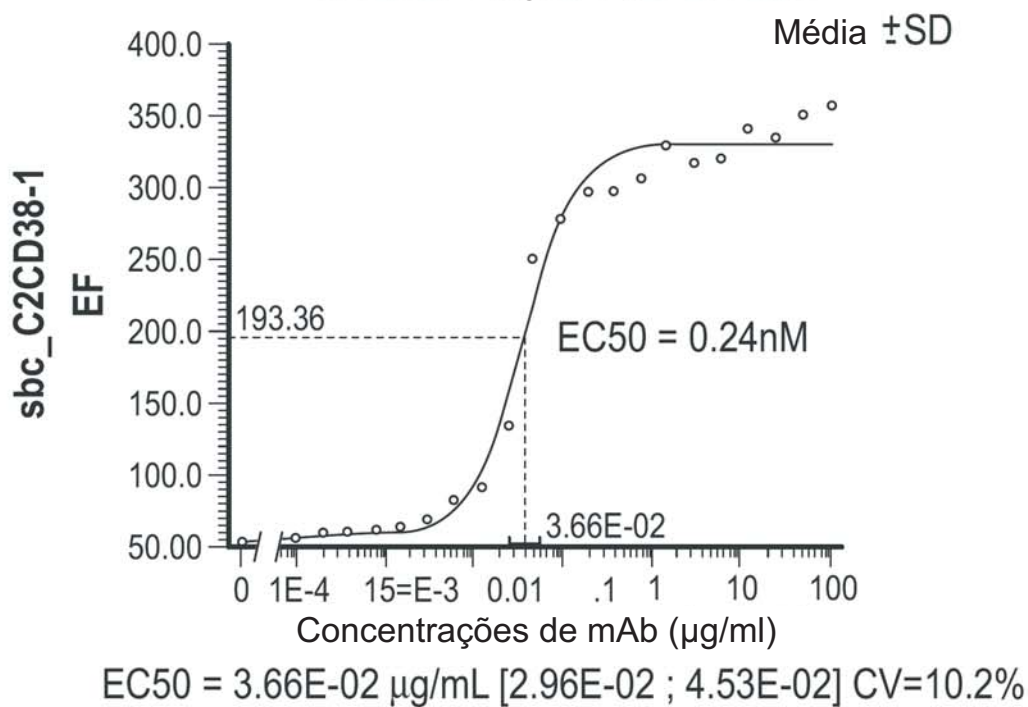
90. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 88, caracterizado pelo fato de que o câncer é leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL) ou um linfoma de células B.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 90, caracterizado pelo fato de que o paciente é um ser humano.

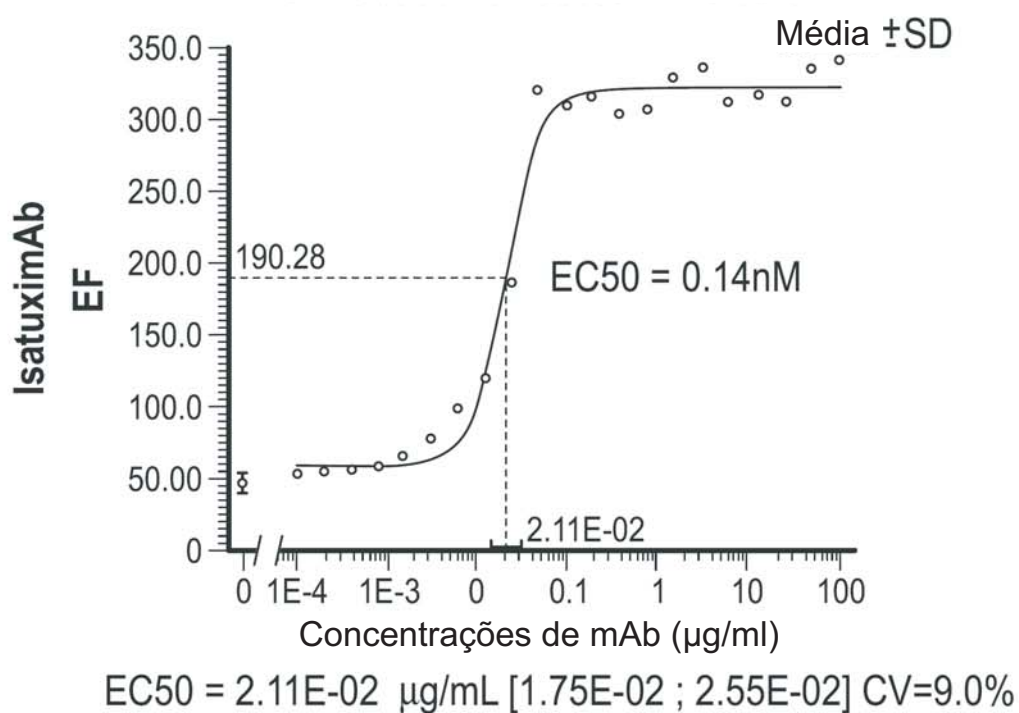
92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 85 a 91, caracterizado pelo fato de que o paciente é selecionado para tratamento porque as células do câncer expressam um polipeptídeo de isoforma E de CD38 humano em sua superfície celular.

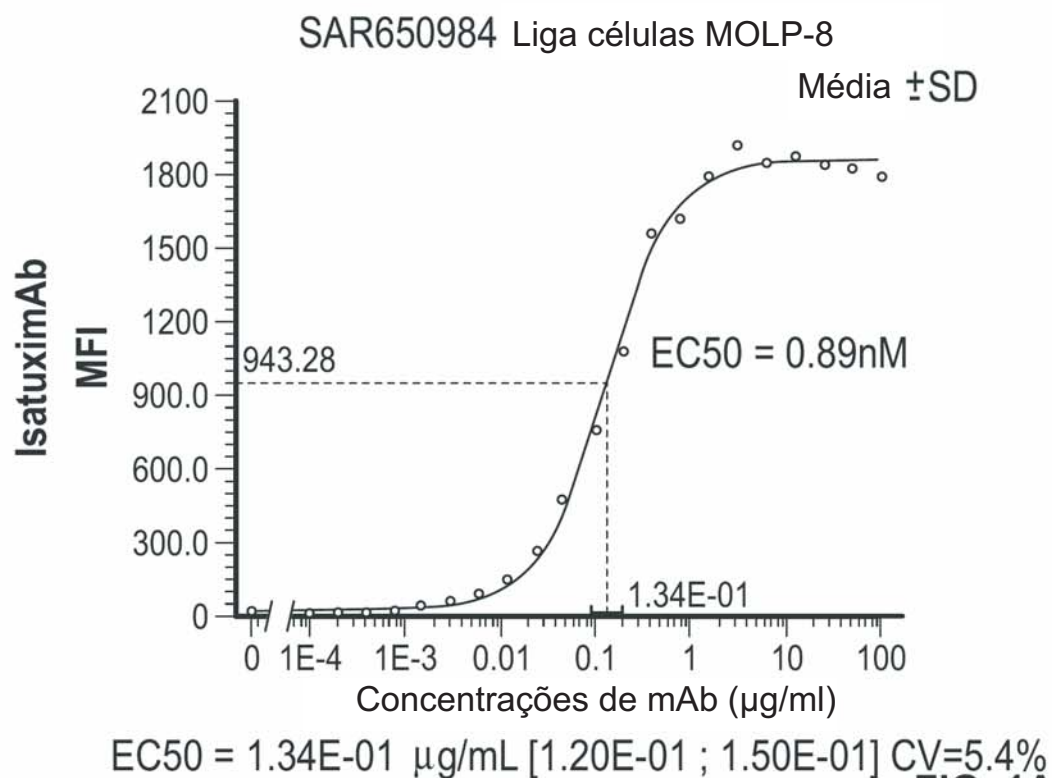
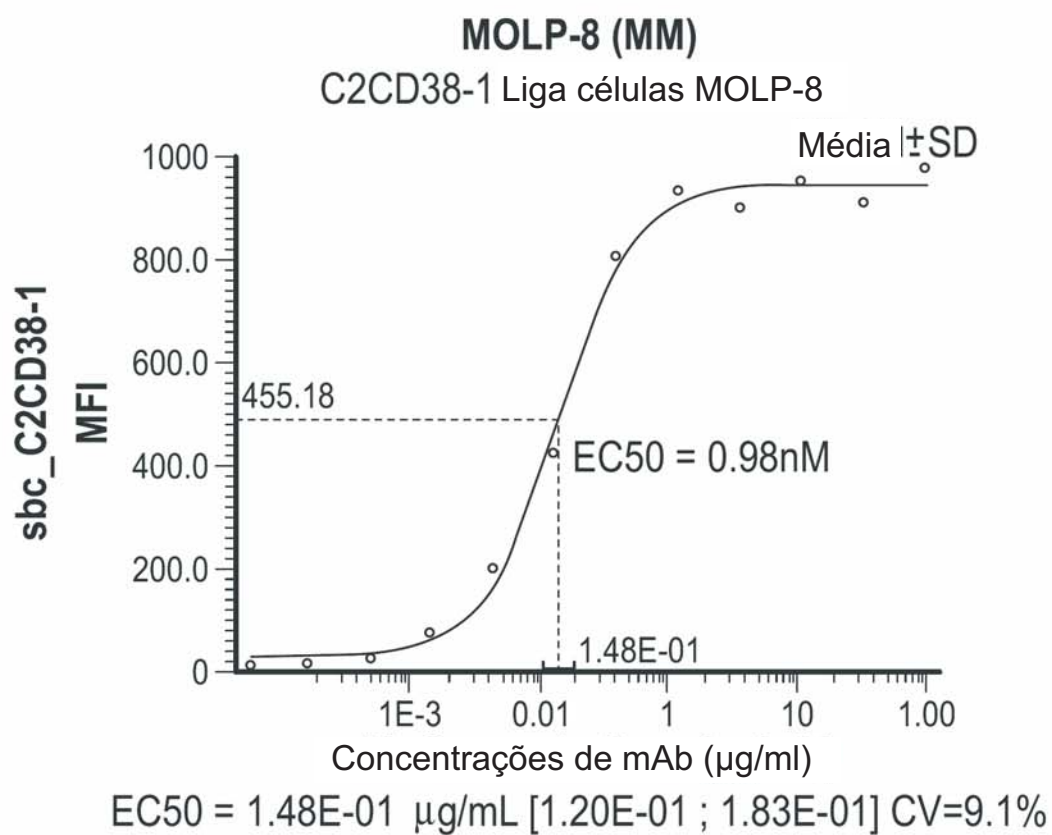
SUDHL8

C2CD38-1 Liga células SUDHL8



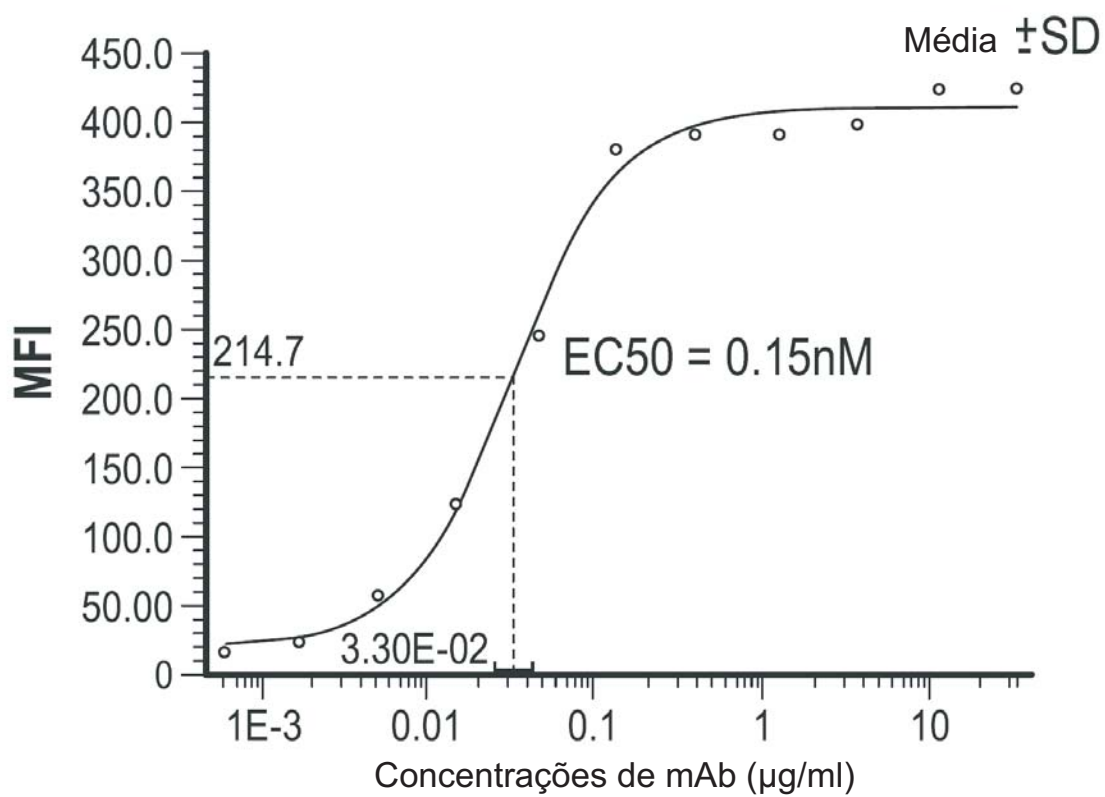
SAR650984 Liga células SUDHL8

**FIG. 1A**

**FIG. 1A (Cont.)**

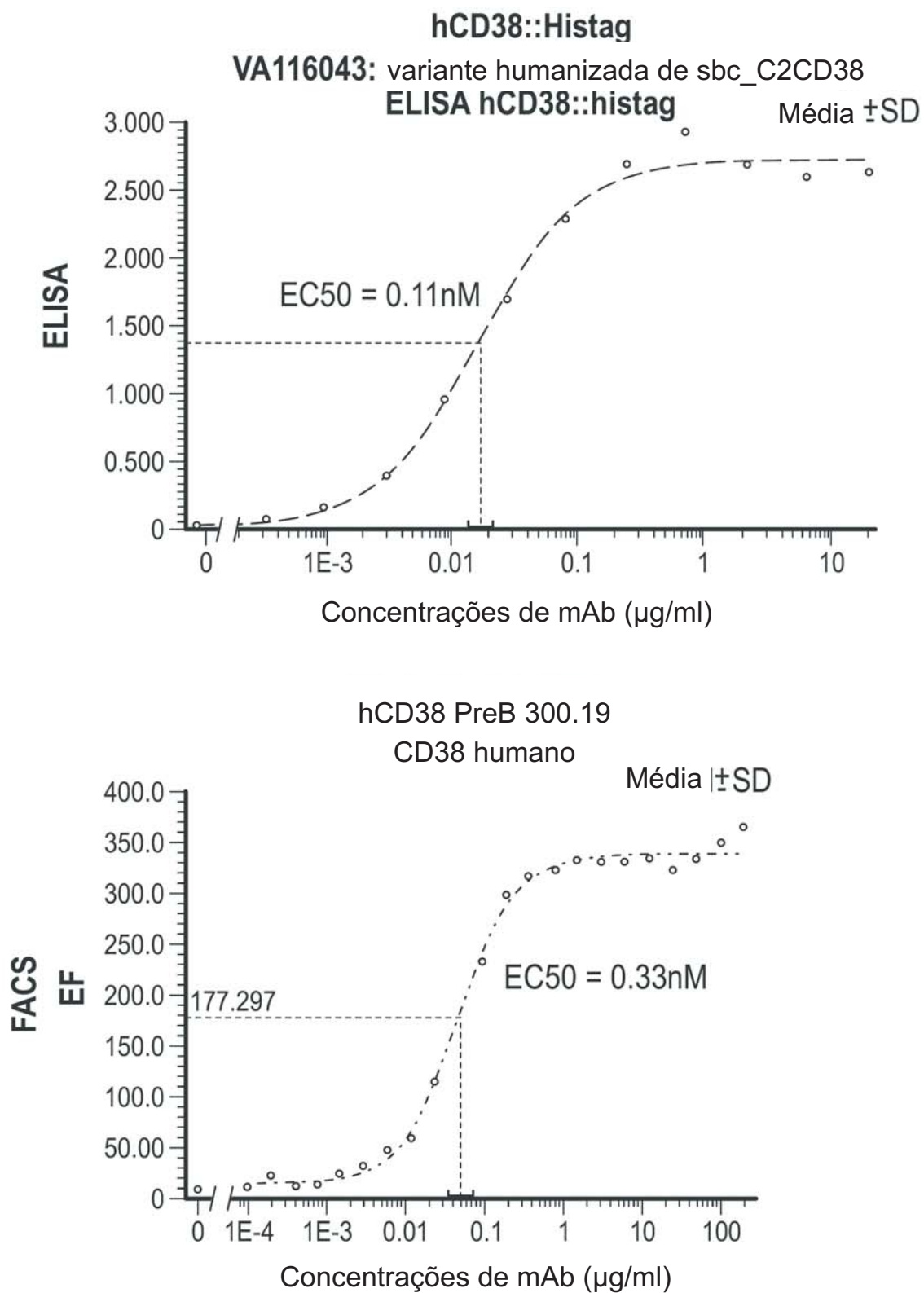
PreB cynoCD38

C2CD38-1 liga células que expressam cynoCD38 PreB



EC50 = 3.30E-02 μ g/mL [2.55E-02 ; 4.26E-02] CV=10.9%

FIG. 1B

**FIG. 2A**

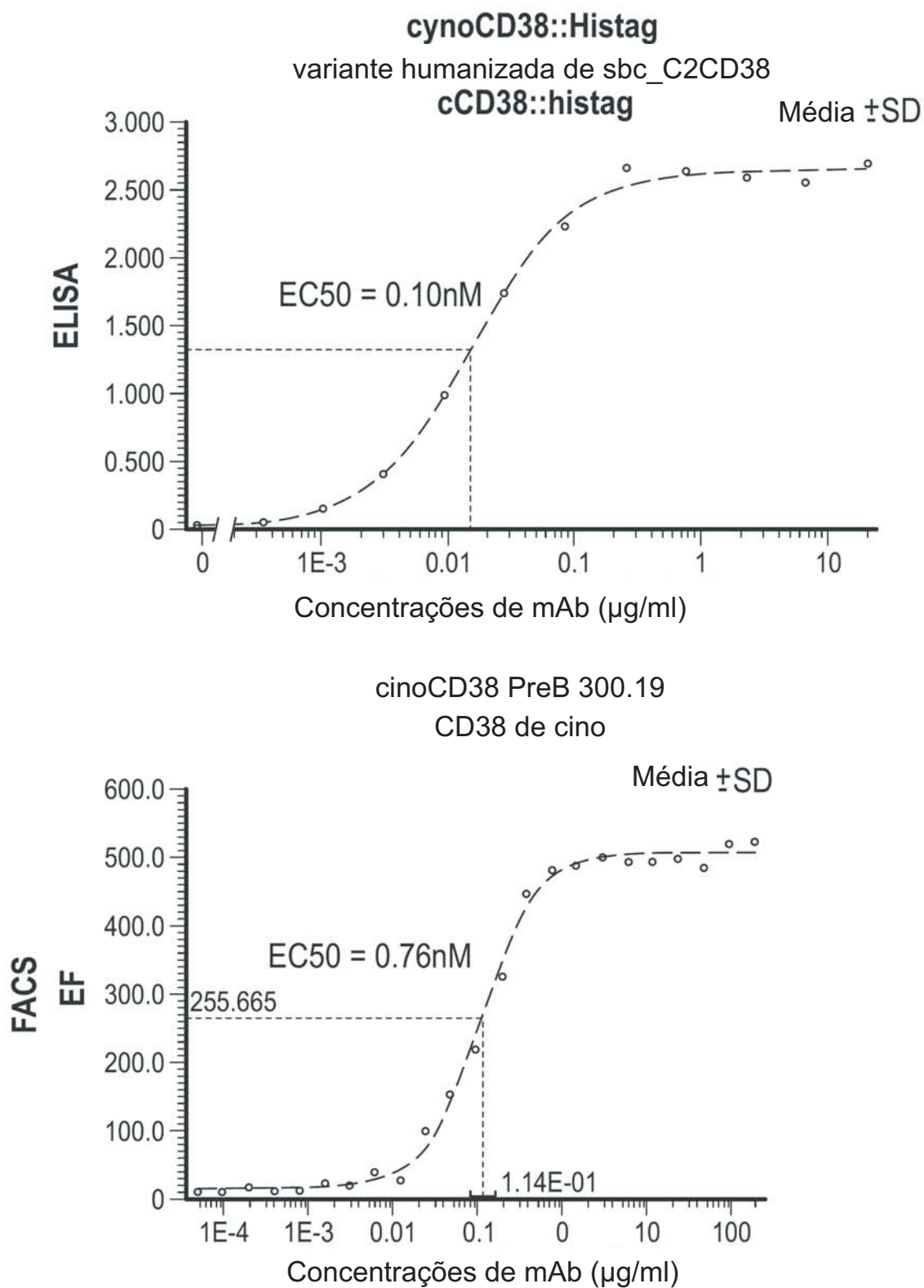


FIG. 2A (Cont.)

hCD38::Histag

Cinética :VA116048-hCD38::His

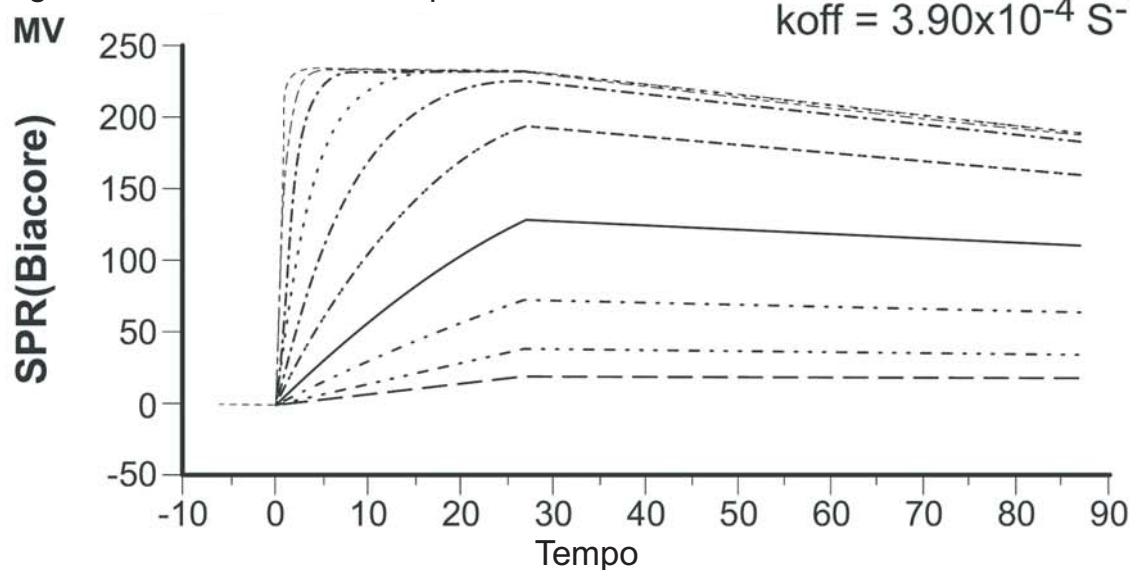
2-1 T4, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

Curva: Alvo de ligando Fc*3-1

4 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

$$K_D = 3.32 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$k_{\text{off}} = 3.90 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

**cynoCD38::Histag**

Cinética :VA116048-cCD38::His

2-1 T4, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

Curva: Alvo de ligando Fc*3-1

4 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

$$K_D = 3.44 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$k_{\text{off}} = 7.84 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

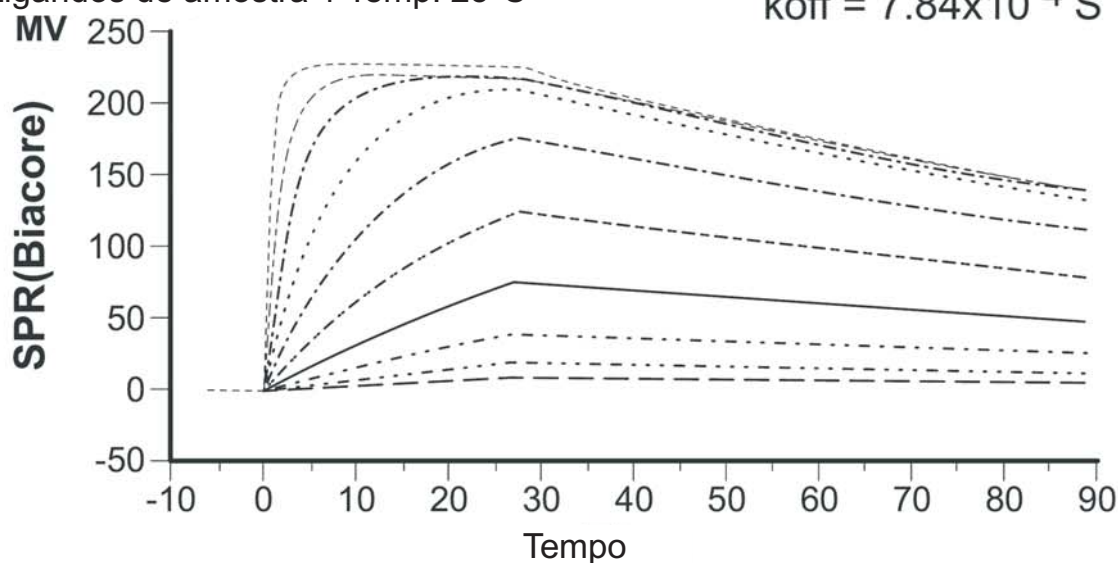
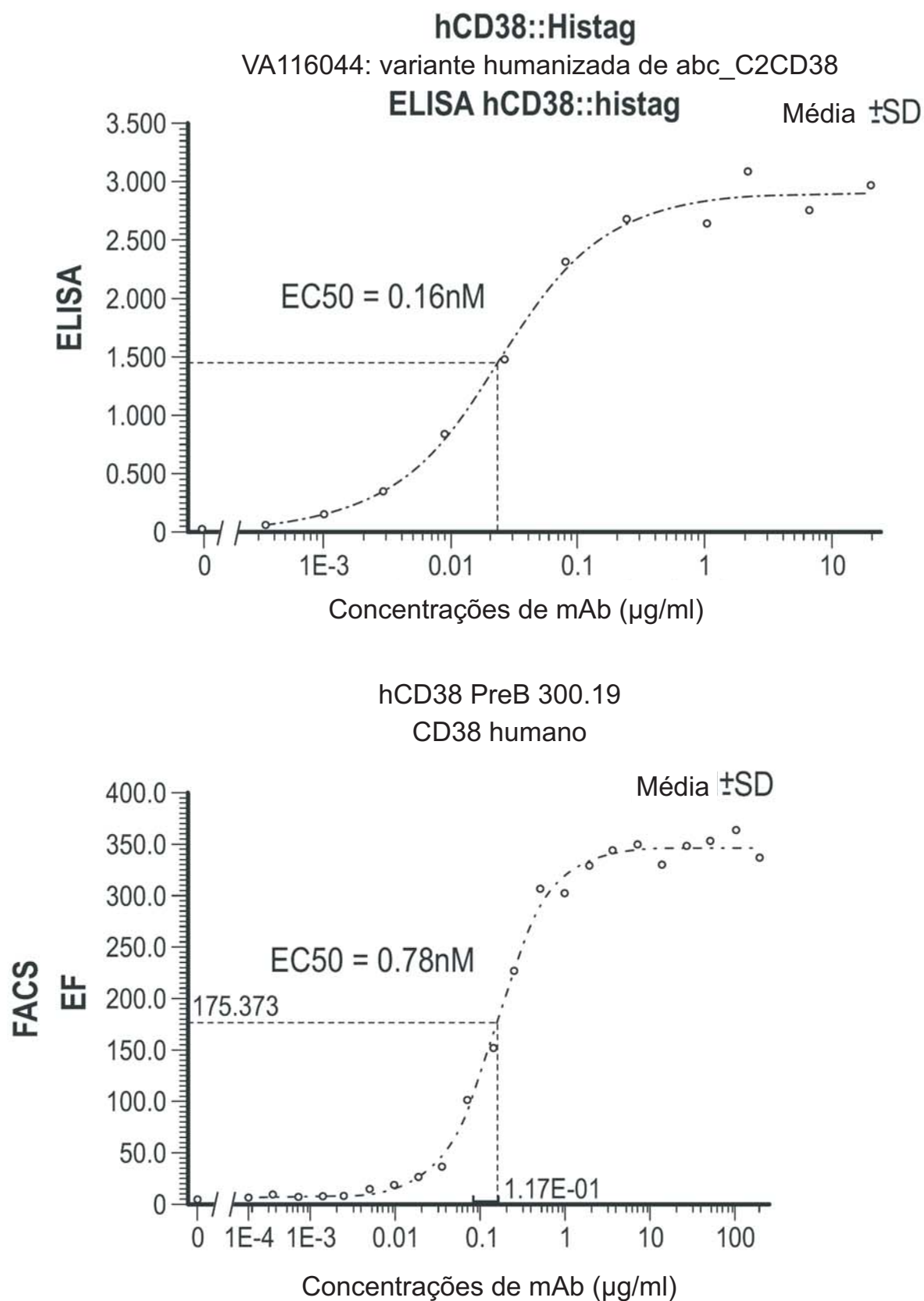


FIG. 2B

**FIG. 2C**

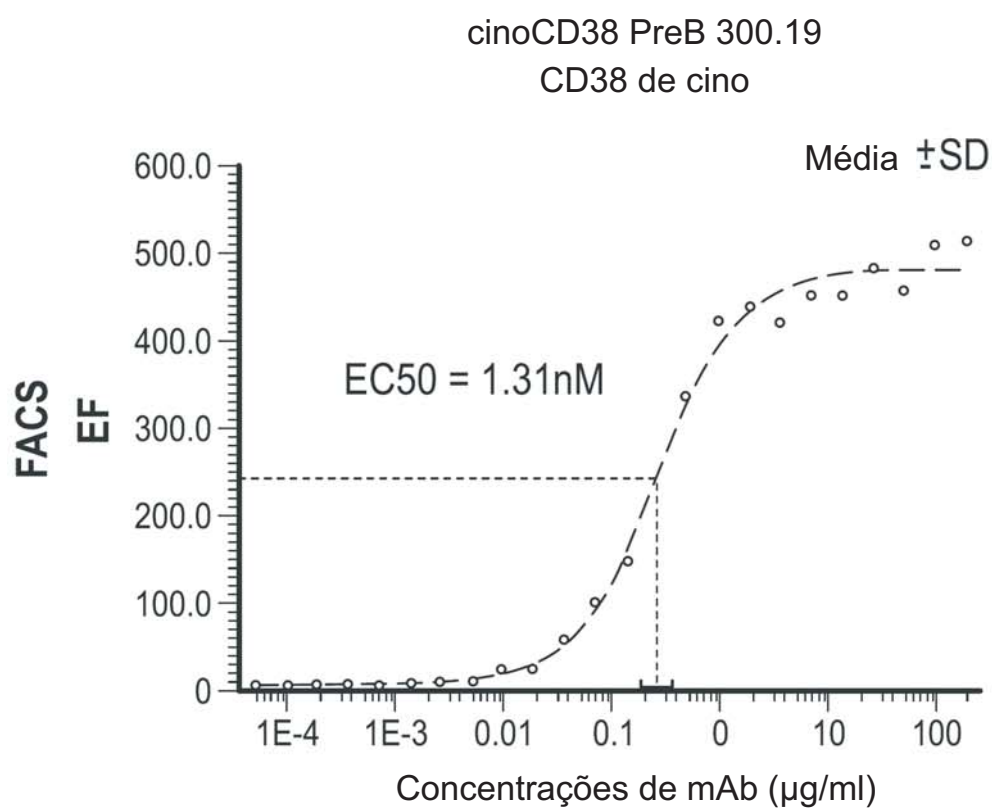
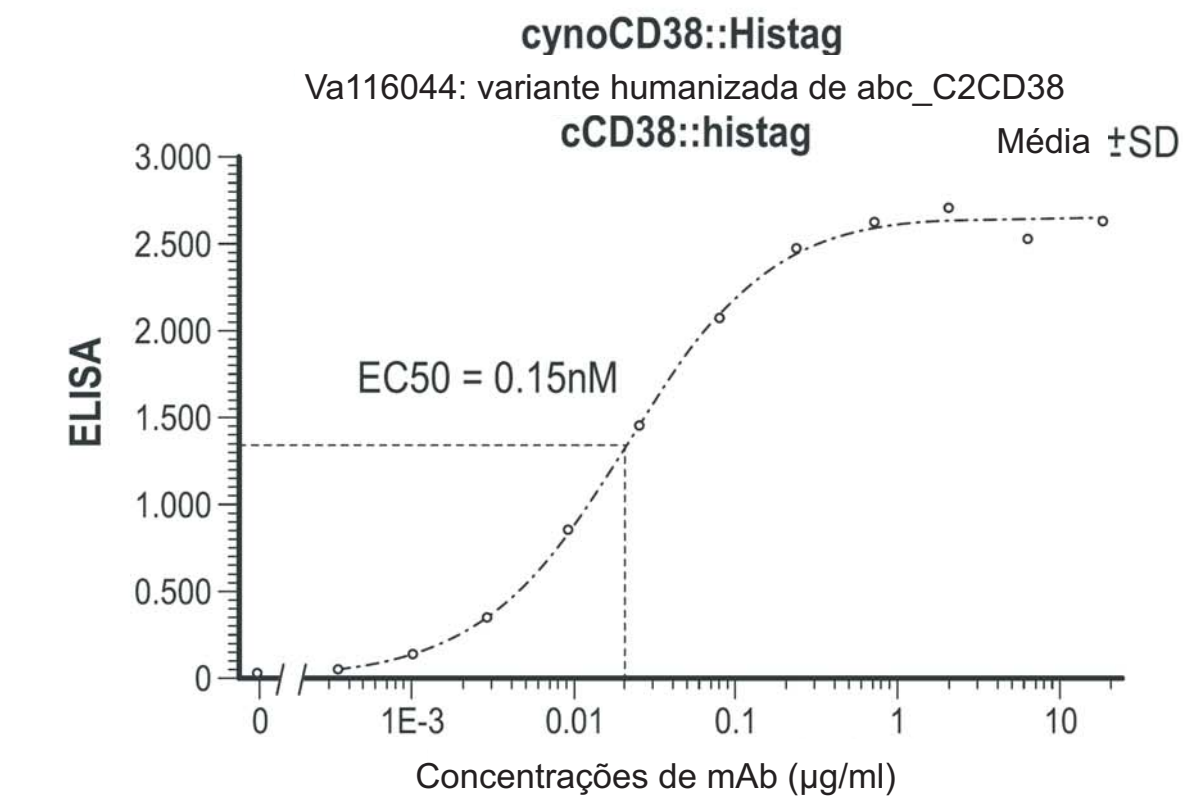


FIG. 2C (Cont.)

hCD38::Histag

Cinética :VA116044-hCD38::His

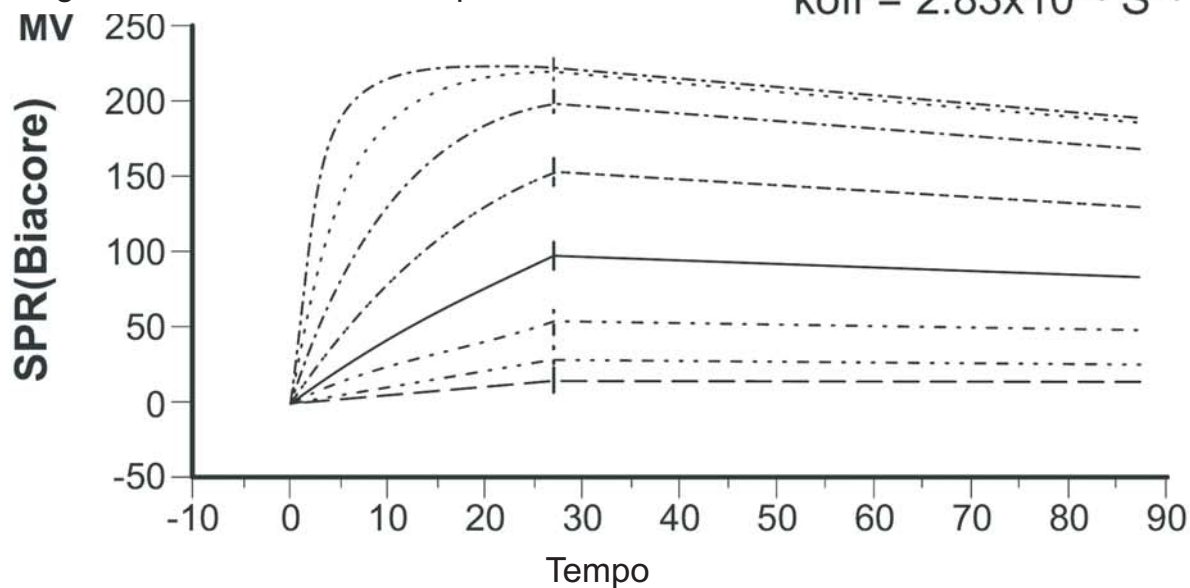
3-1 T5, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

Curva: Alvo de ligando Fc*3-1

5 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

$$K_D = 4.83 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$k_{off} = 2.83 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

**cinoCD38::Histag**

Cinética :VA116044-cCD38::His

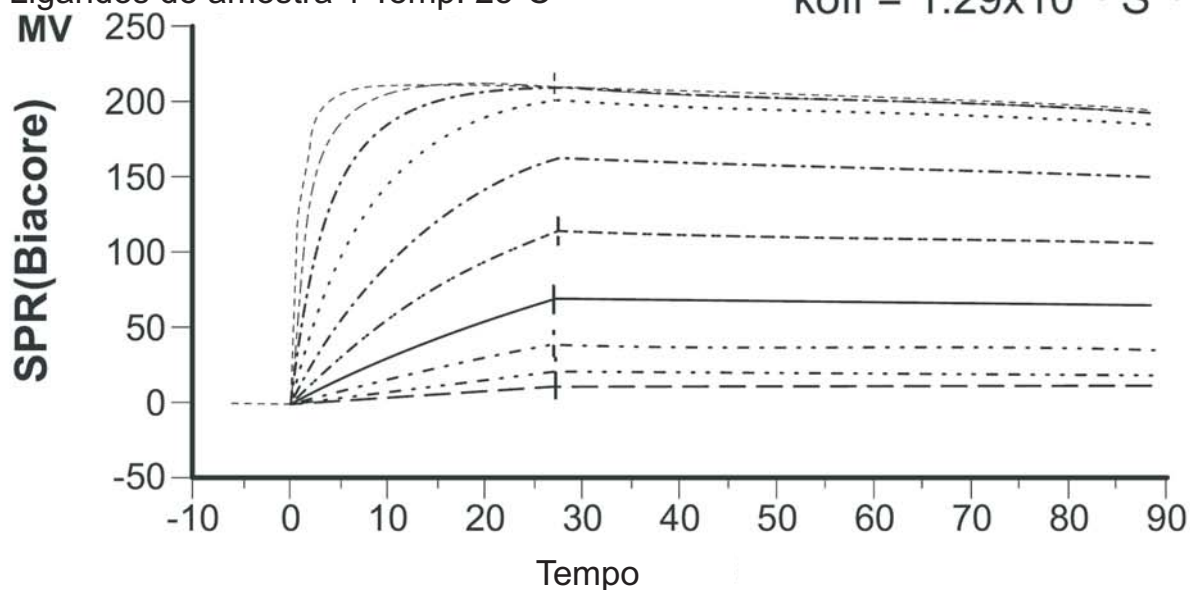
3-1 T5, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

Curva: Alvo de ligando Fc*3-1

5 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

$$K_D = 7.10 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$k_{off} = 1.29 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

**FIG. 2D**

10/108

hCD38::Histag

VA116049: variante humanizada de sbc_C2CD38

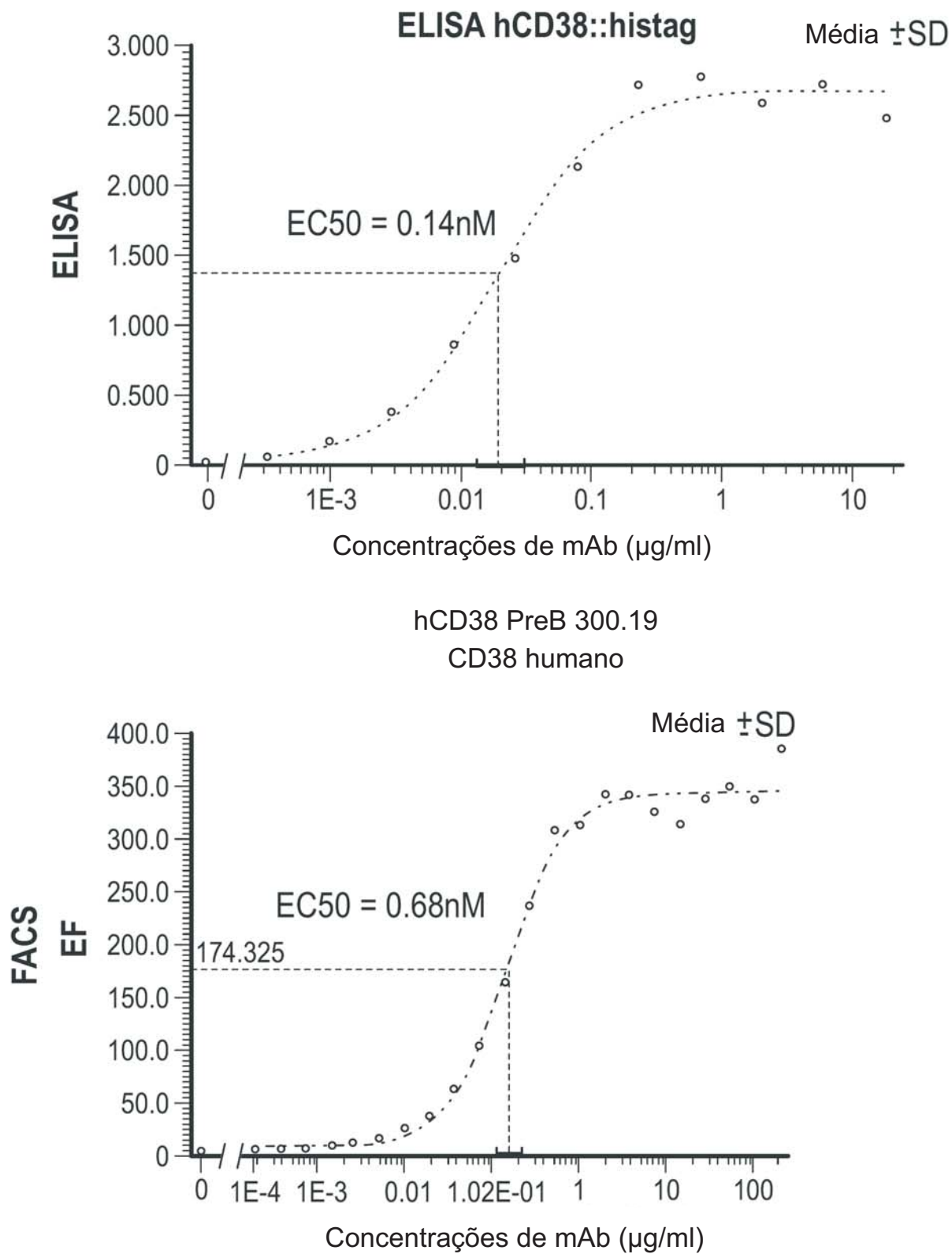
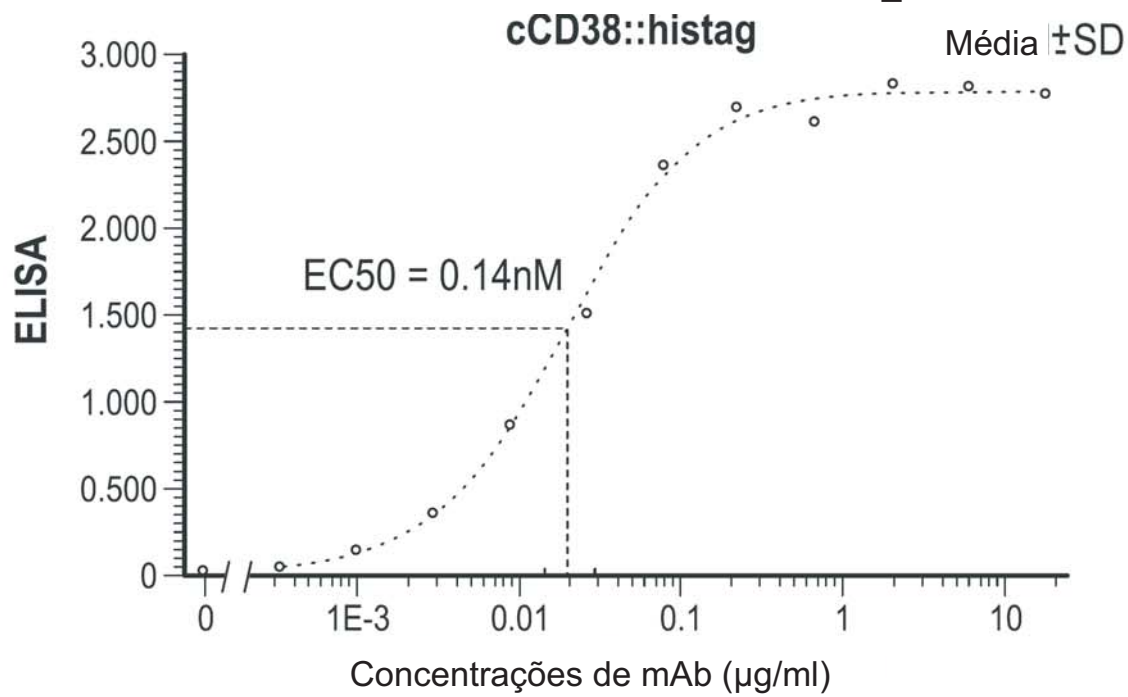


FIG. 2E

11/108

cinoCD38::Histag

Va116049: variante humanizada de sbc_C2CD38



cinoCD38 PreB 300.19

CD38 de cino

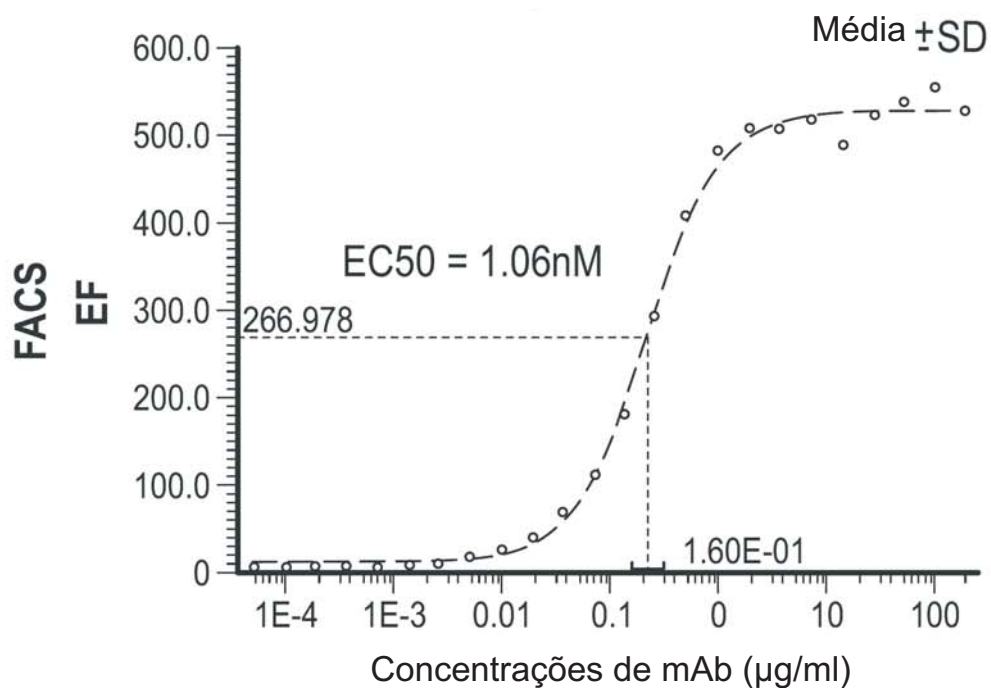


FIG. 2E (Cont.)

hCD38::Histag

Cinética :VA116049-hCD38::His

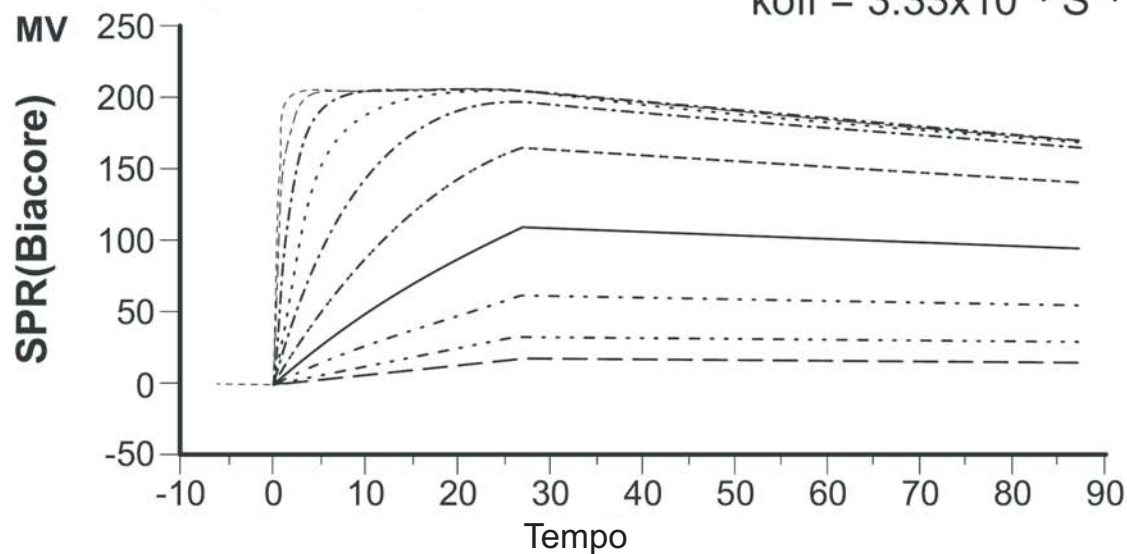
2-4 T4, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

Curva: Alvo de ligando Fc*2-1

4 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

$$K_D = 3.12 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$k_{off} = 3.33 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

**cinoCD38::Histag**

Cinética :VA116049-cCD38::His

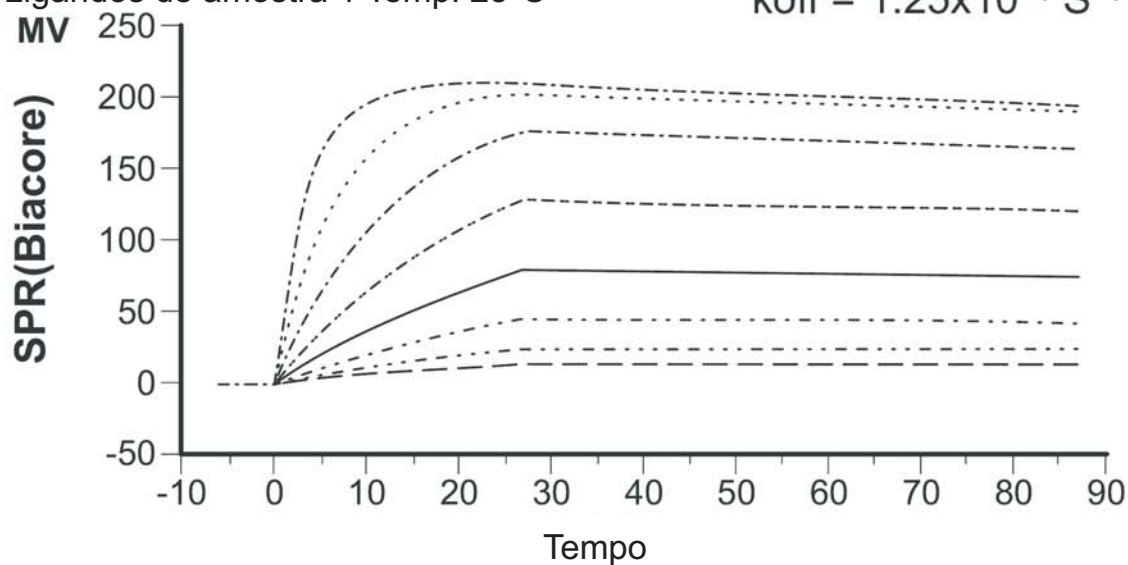
2-4 T4, Ajuste: '1. 1:1 Ligação'

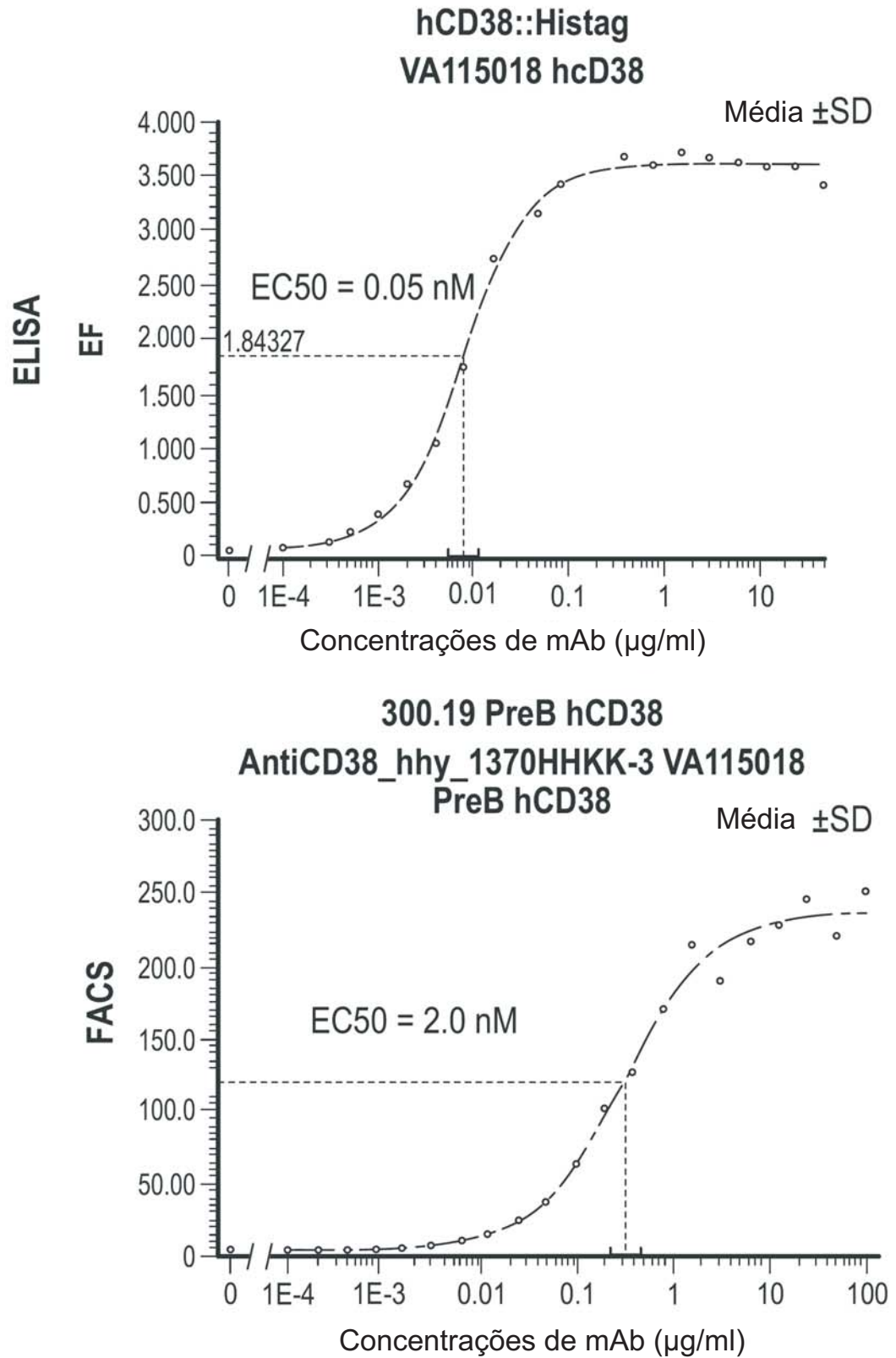
Curva: Alvo de ligando Fc*2-1

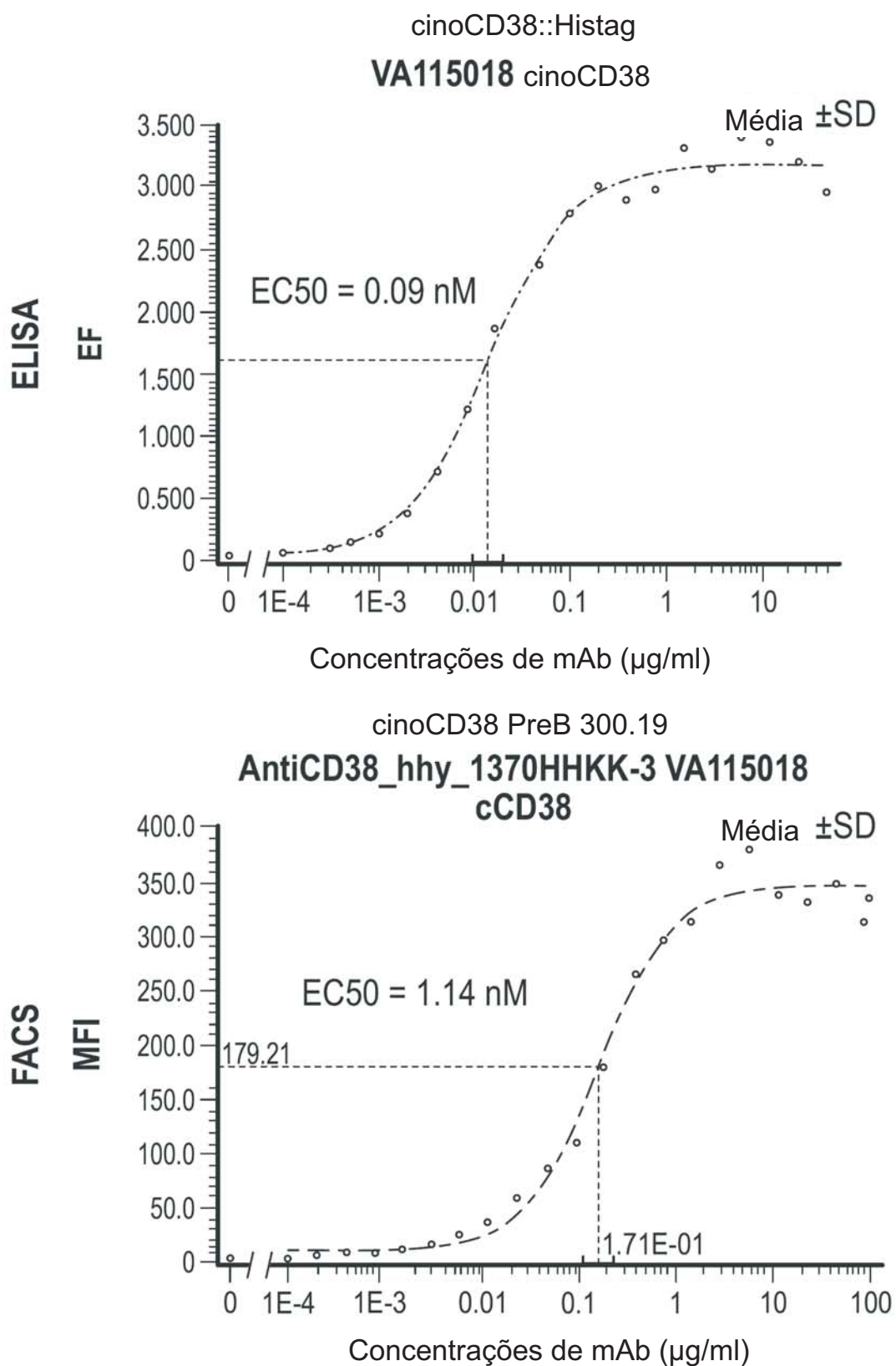
4 Ligandos de amostra 1 Temp. 25°C

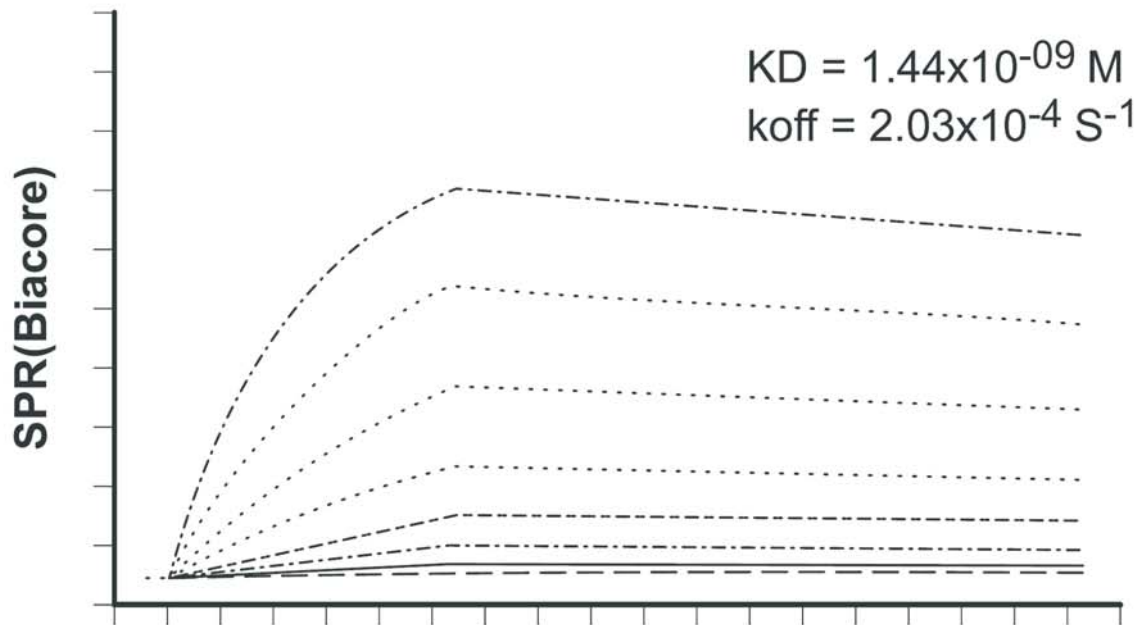
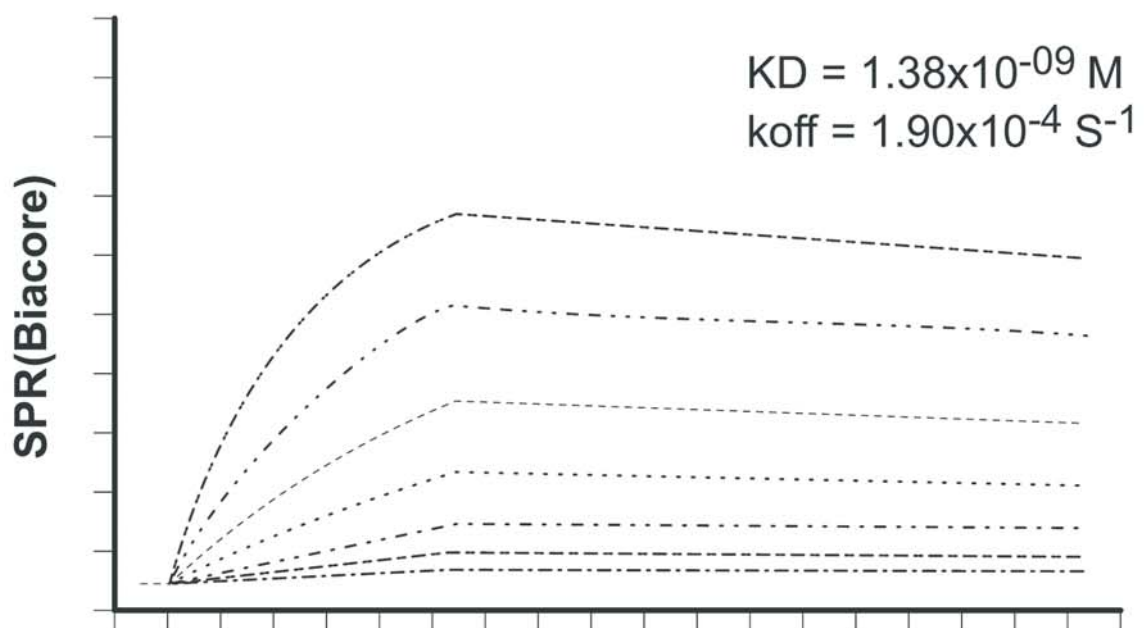
$$K_D = 5.63 \times 10^{-10} \text{ M}$$

$$k_{off} = 1.25 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$$

**FIG. 2F**

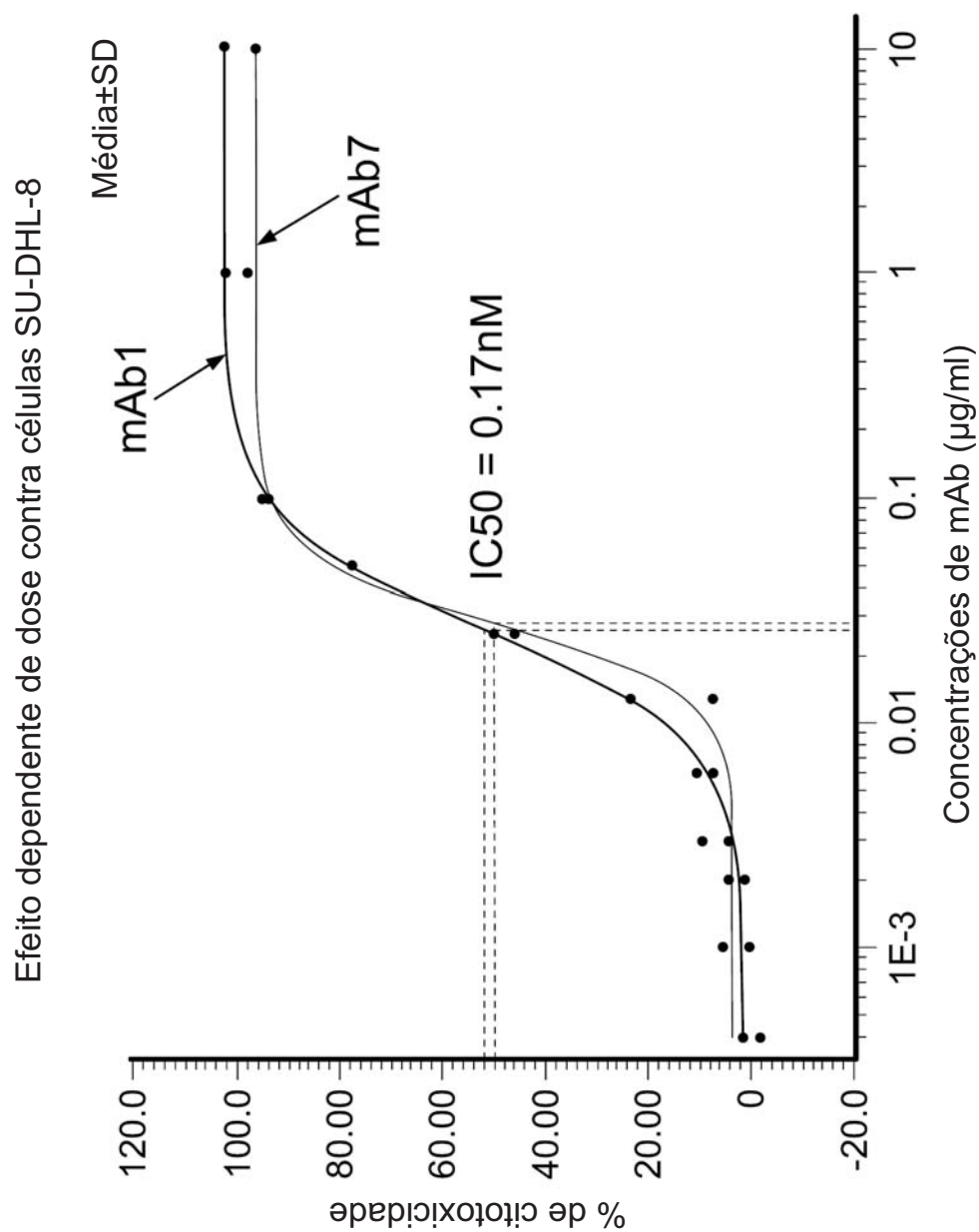
**FIG. 2G**

**FIG. 2G (Cont.)**

hCD38::Histag**cinoCD38::Histag****FIG. 2H**

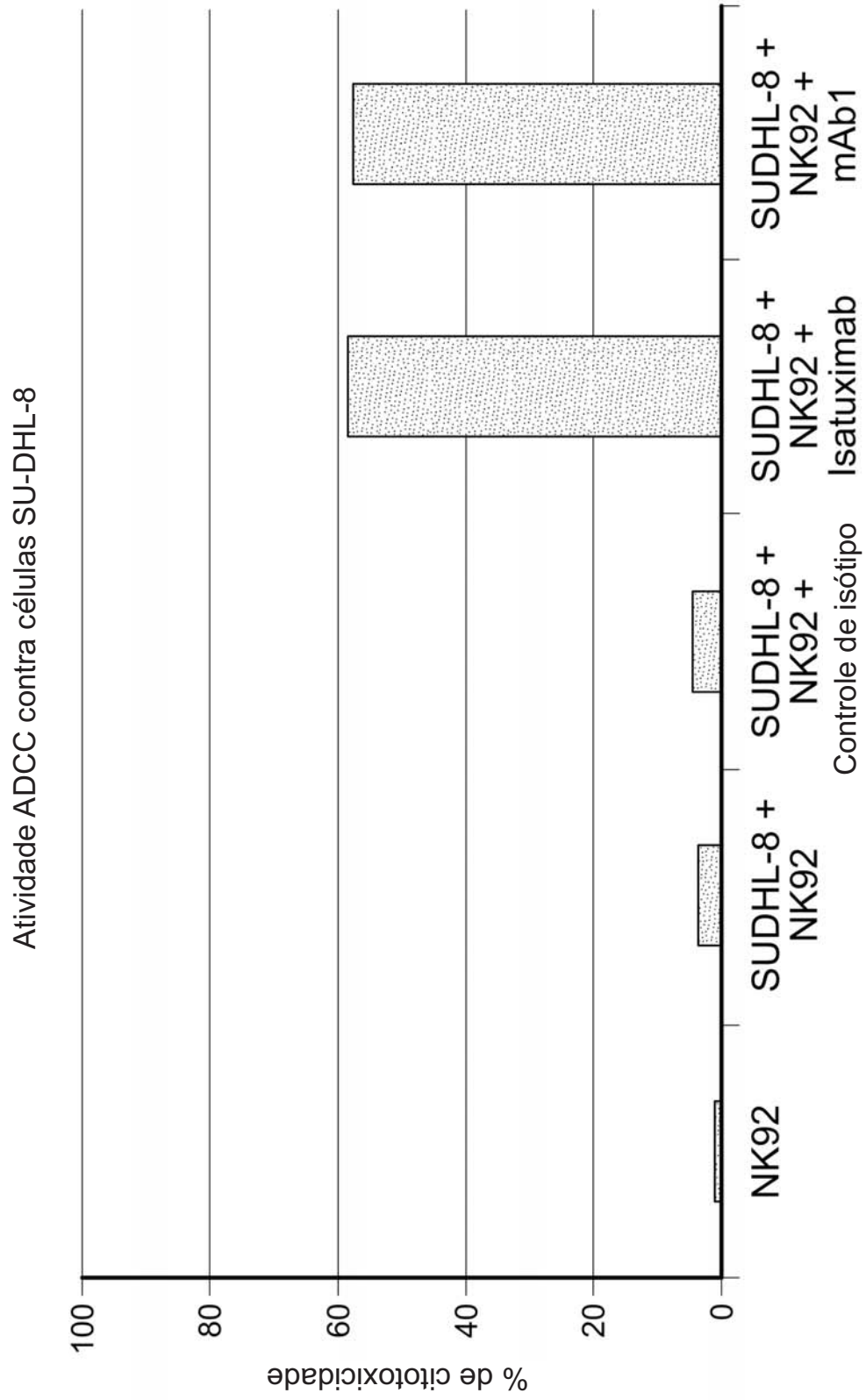
	Nomenclatura INN	ELISA EC50 nM		SPR KD nM		FACS EC50 nM		Identidade de região V humana	
		hu	cyno	hu	cyno	hu	cyno	H	L
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL1-VH1	-zumAb	0.11	0.10	0.33	3.44	0.33	0.76	84.7%	87.1%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH3	-zumAb	0.16	0.15	0.48	0.71	0.78	1.31	83.7%	83.9%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH5	-zumAb	0.16	0.17	0.82	1.14	0.55	1.15	80.6%	83.9%
AntiCD38_sbc_C2CD38-1_VL3-VH6	-zumAb	0.14	0.14	0.31	0.56	0.68	1.06	81.6%	83.9%
AntiCD38_hhy_1370HHKK-3	-umAb	0.05	0.09	1.44	1.38	2.00	1.14	99.0%	95.8%

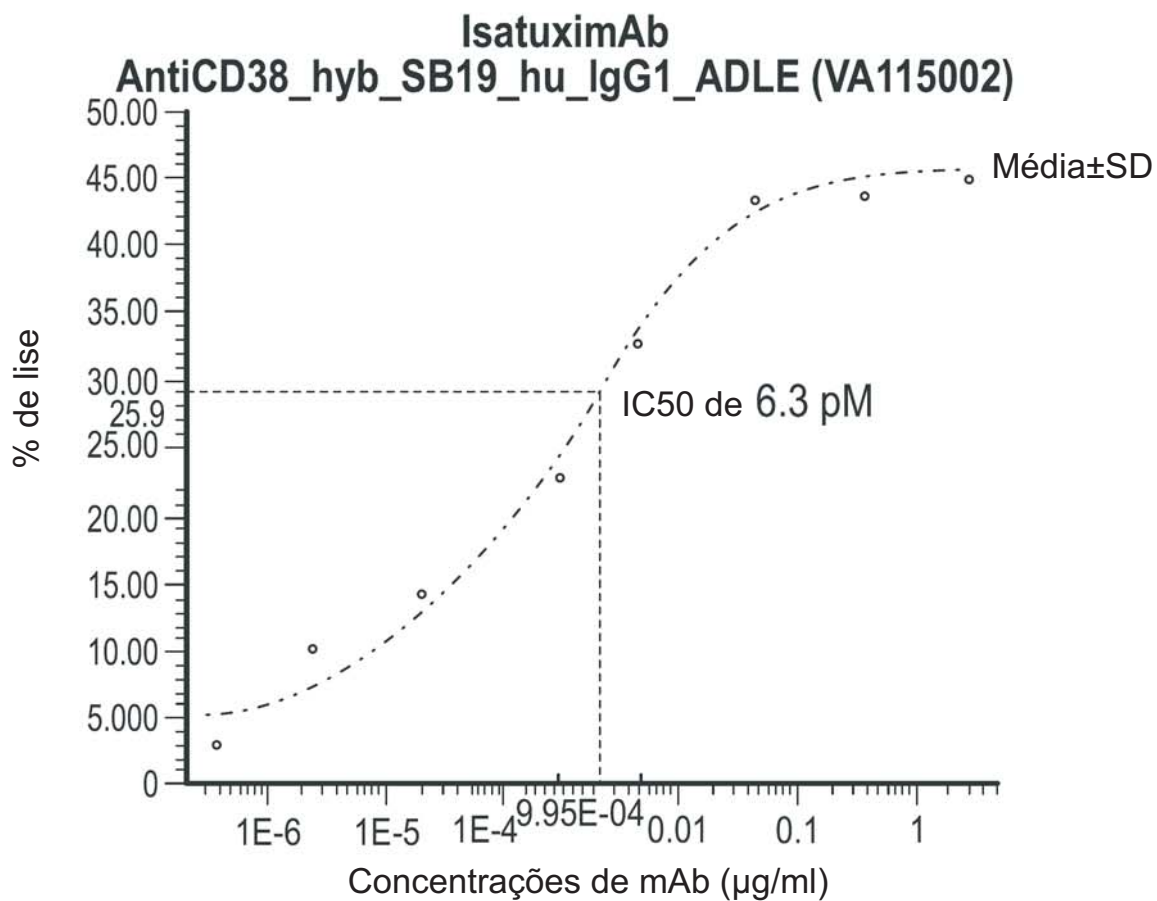
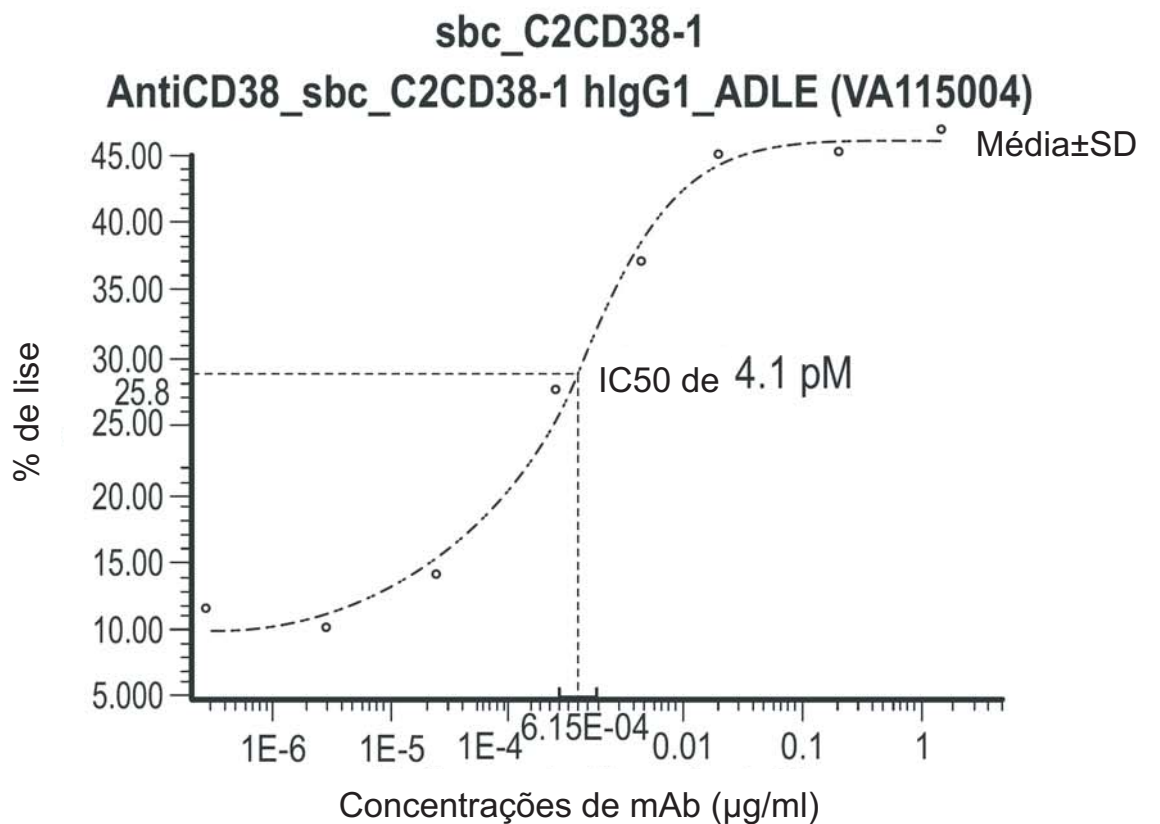
FIG. 2I



— [A]1/VA1 15004 (2.63E-02) — [A]2/VA1 15002 (2.83E-02)

FIG. 2J

**FIG. 2K**

**FIG. 2L**

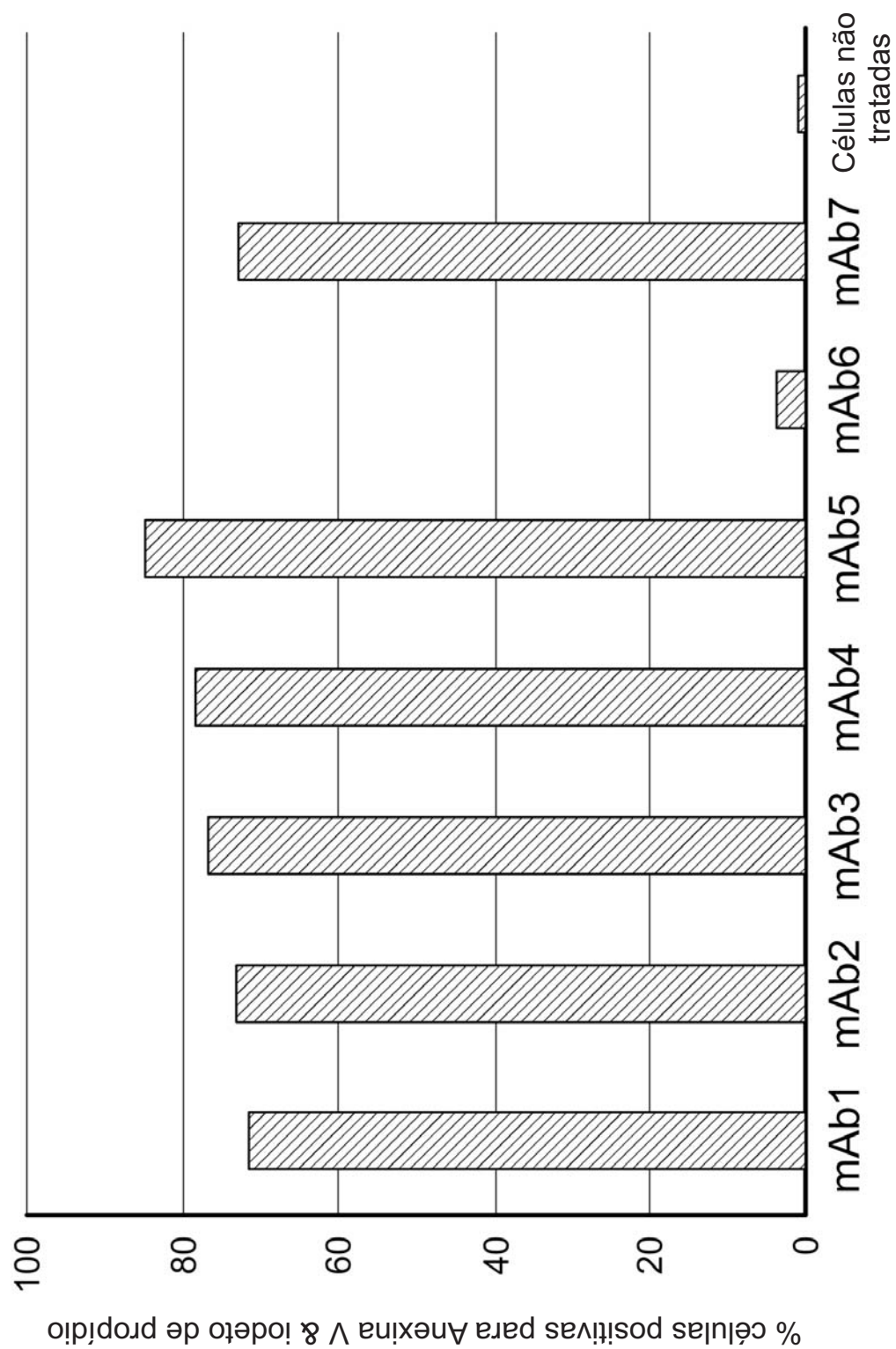


FIG. 2M

21/108

VA116043

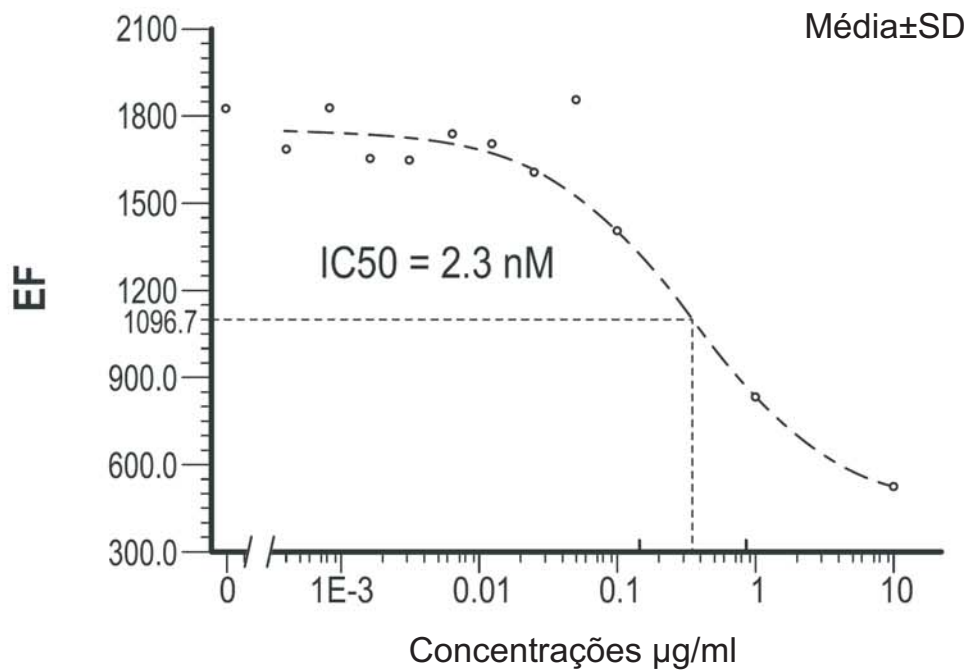


FIG. 2N

VA116044

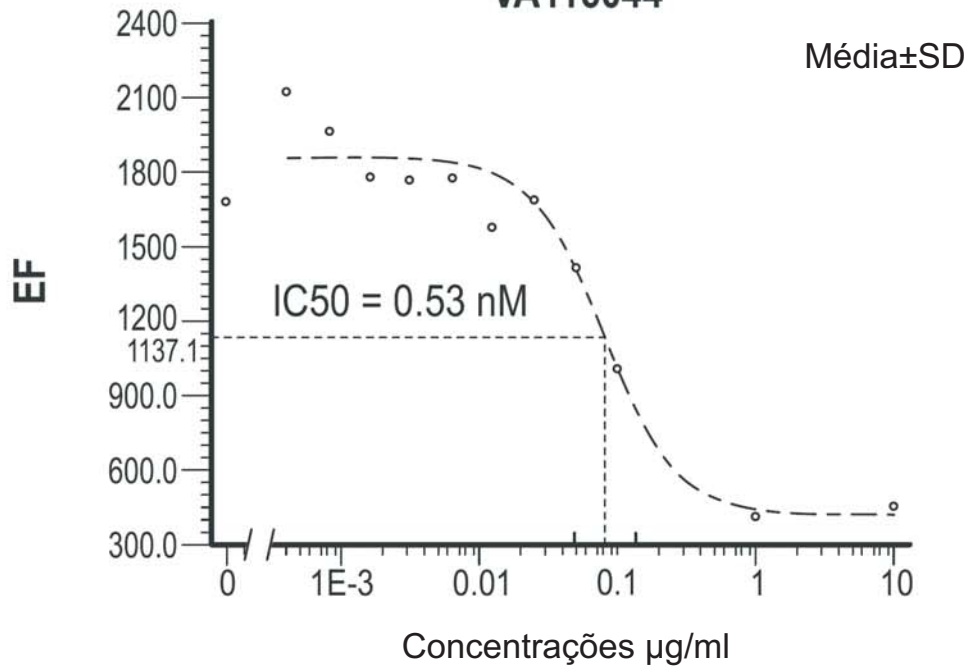


FIG. 2O

22/108

VA116047

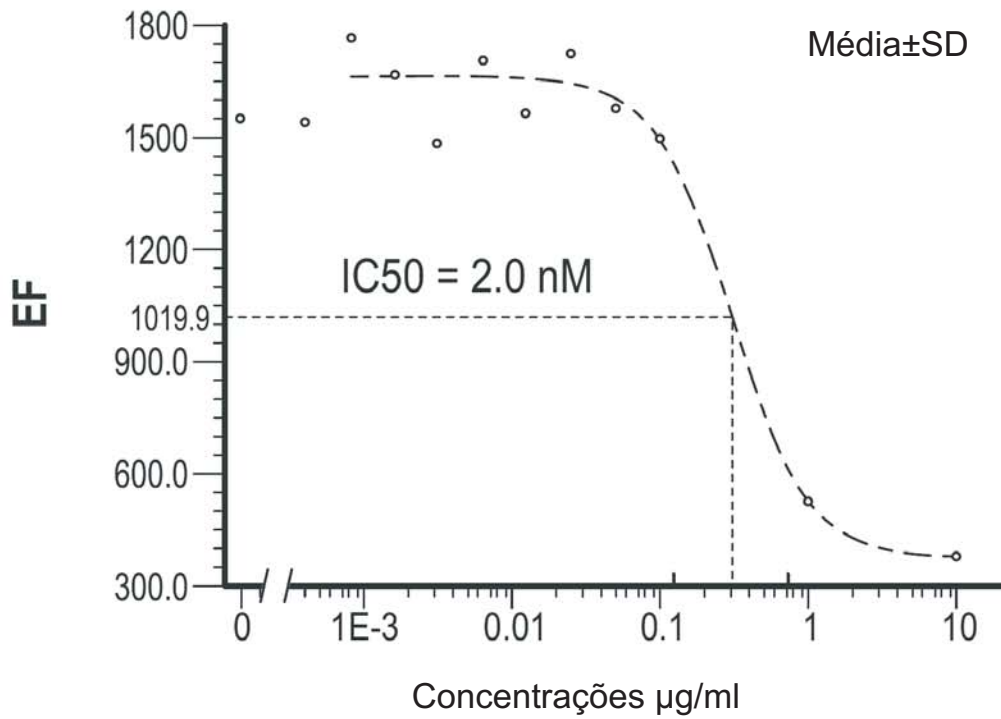


FIG. 2P

VA116049

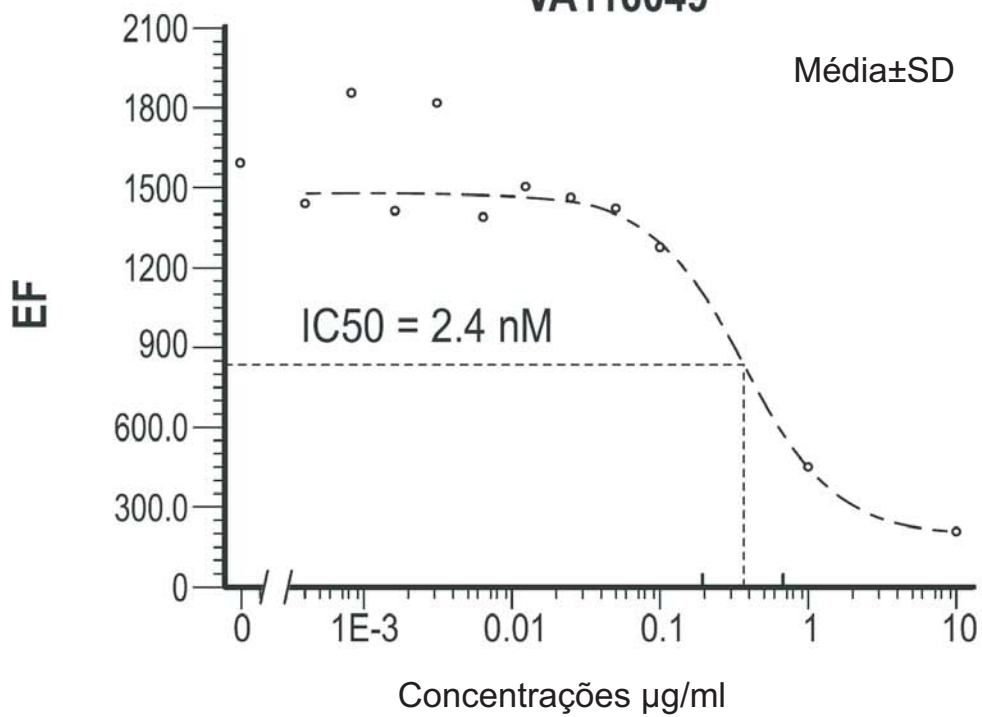
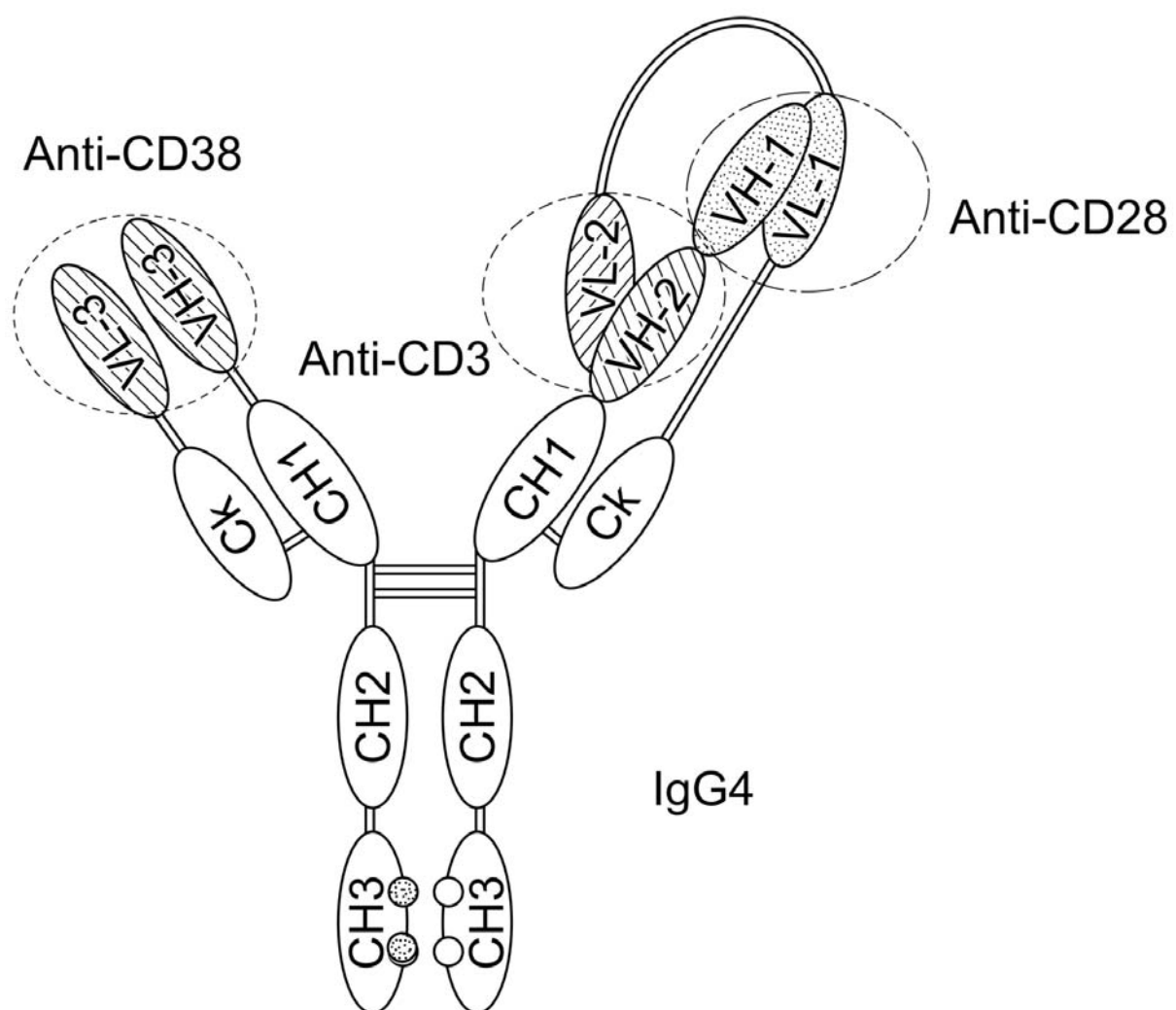


FIG. 2Q

**FIG. 3A**

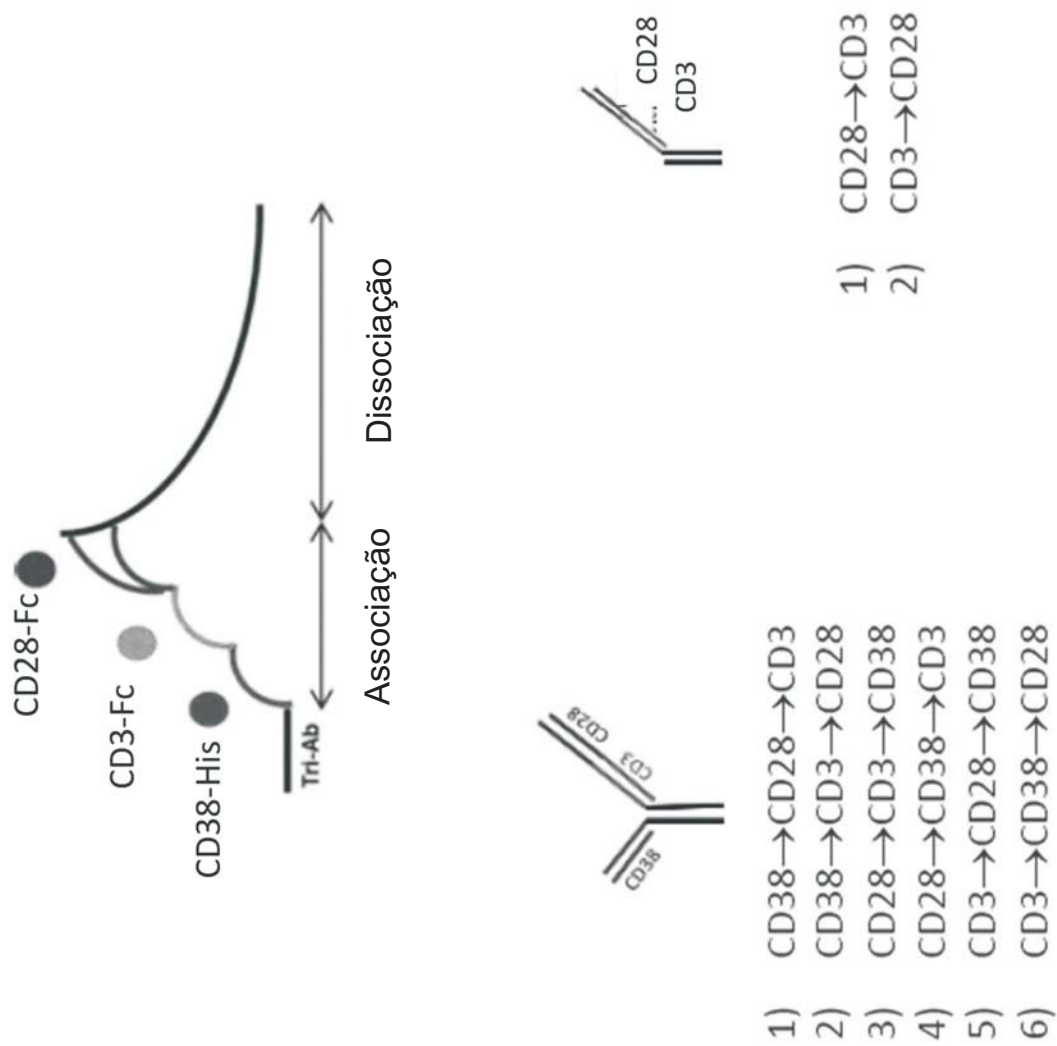


FIG. 3B

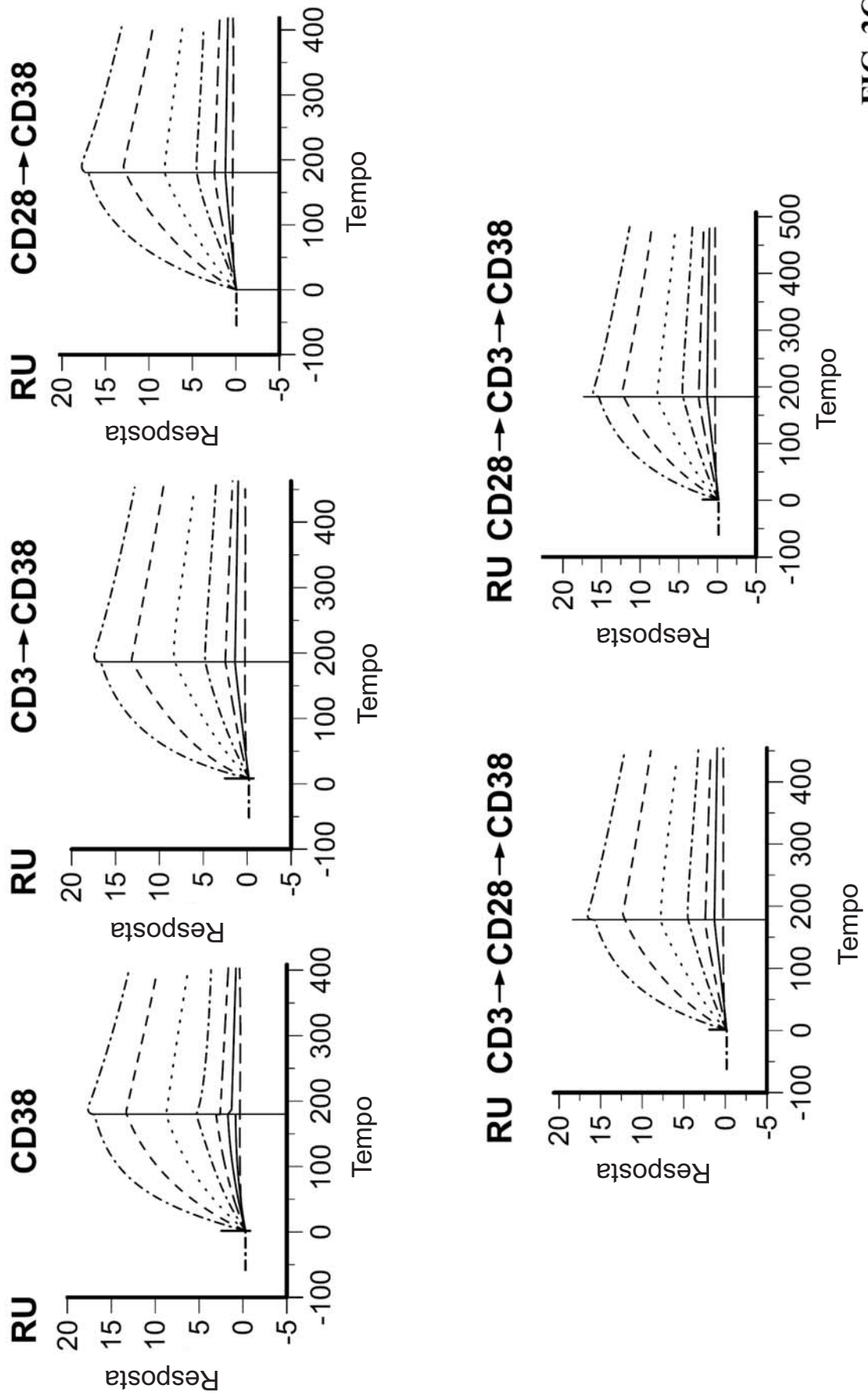
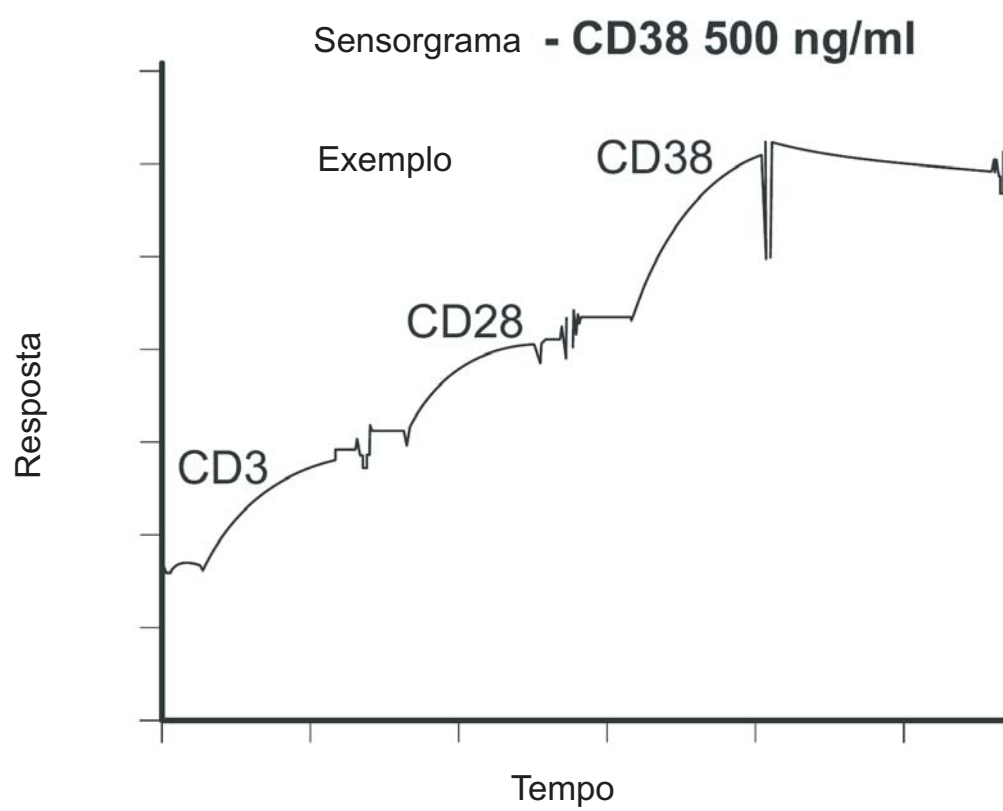


FIG. 3C

**FIG. 4**

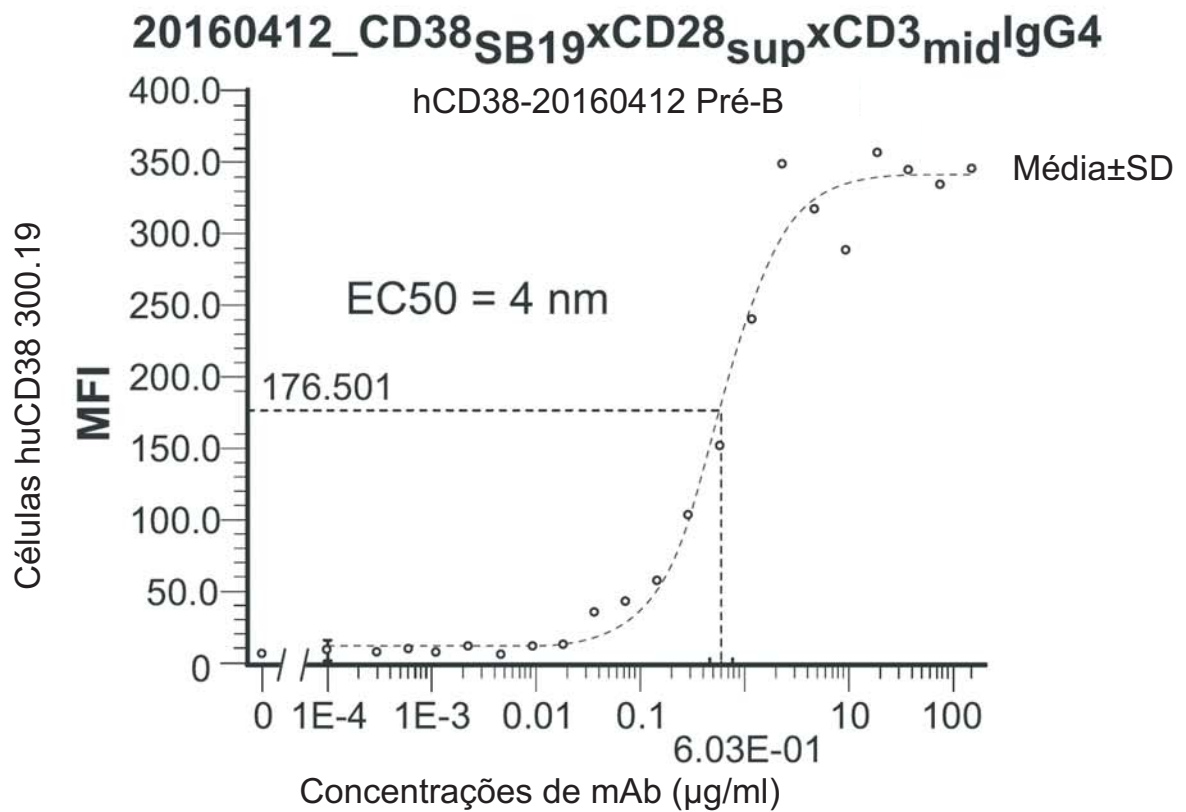
Afinidade de TsAbs WT para alvos individuais (K_D arredondada para número inteiro)

TsAbs	CD38	CD28	CD3	Classificação de ordem de afinidade
CD38 _{SB19} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	2 nM	3 nM	23 nM	Ligação de CD38 MsAb $\approx$ TsAbs
CD38 _{SB19} CD28 _{cvn} CD3 _{mid}	2 nM	17 nM	19 nM	
CD38 _{VH1} CD28 _{sup} CD3 _{mid/low}	4/6 nM	2/4 nM	21/76 nM	Ligação de CD28 MsAb > TsAb $\geq$ BsAbs
CD38 _{VH1} CD28 _{cvn} CD3 _{mid/low}	4/6 nM	18/34 nM	23/59 nM	
CD38 _{HHY1370} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	1 nM	5 nM	48 nM	Ligação de CD3 MsAb $\approx$ BsAb $\approx$ TsAb
CD38 _{HHY1370} CD28 _{cvn} CD3 _{mid}	1 nM	19 nM	44 nM	

Impacto de ligação multialvo a CD38_{SB19} CD28_{sup} CD3_{mid}

Estado de TsAbs	CD38	CD28	CD3	Comentários
Alvo único	2 nM	3 nM	23 nM	Cinética rápida de ligação de CD3 quando todos os alvos estão presentes
Todos os alvos	2 nM	4 nM	19 nM	

FIG. 5



6.03E-01 [4.78E-0.1 ; 7.60E-01] μ g/mL CV= 11.2%

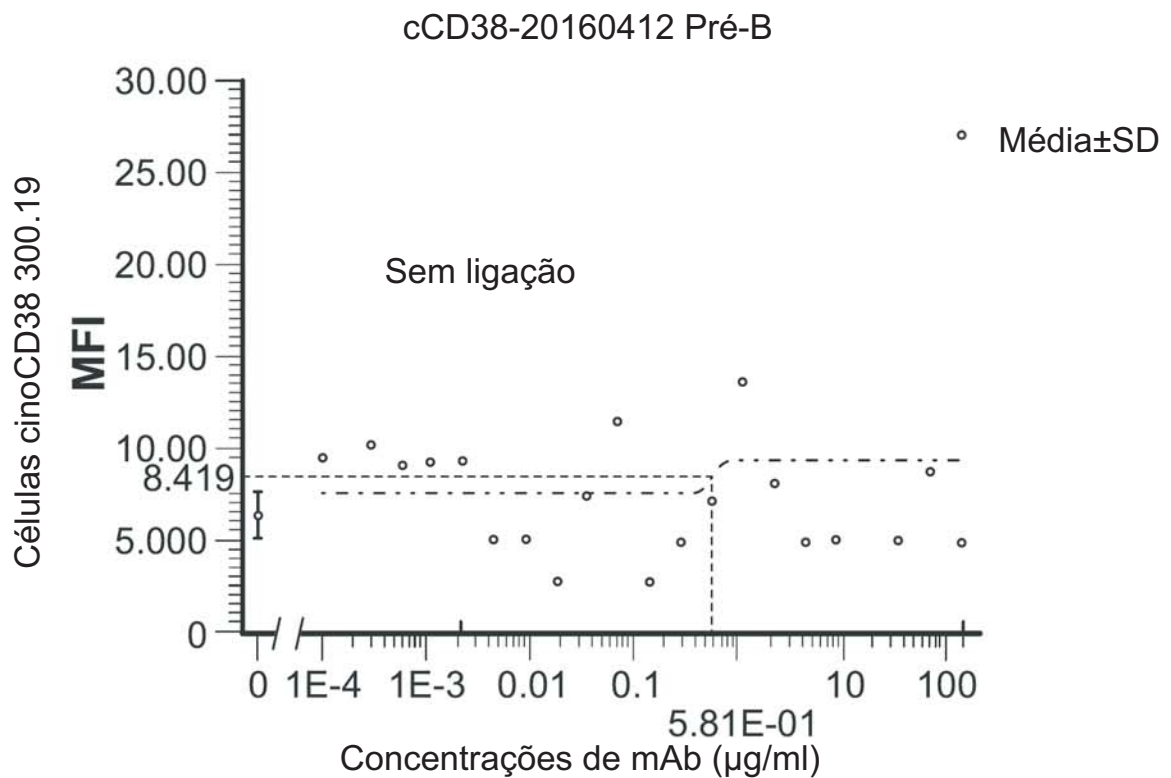
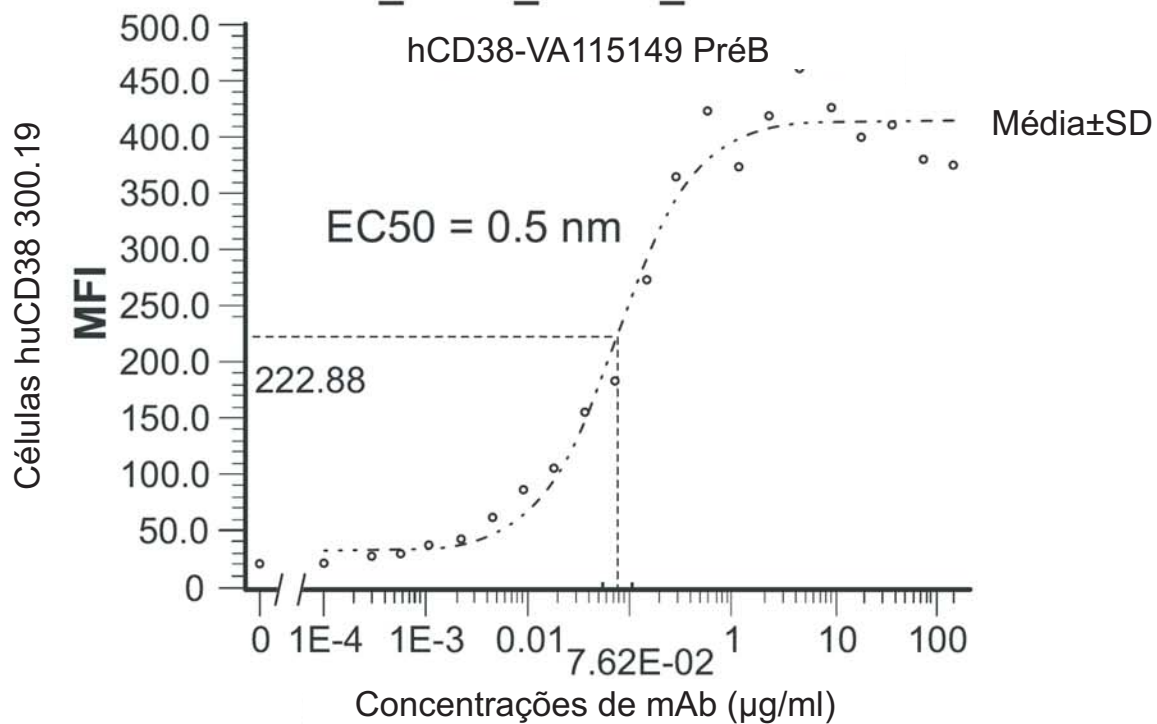
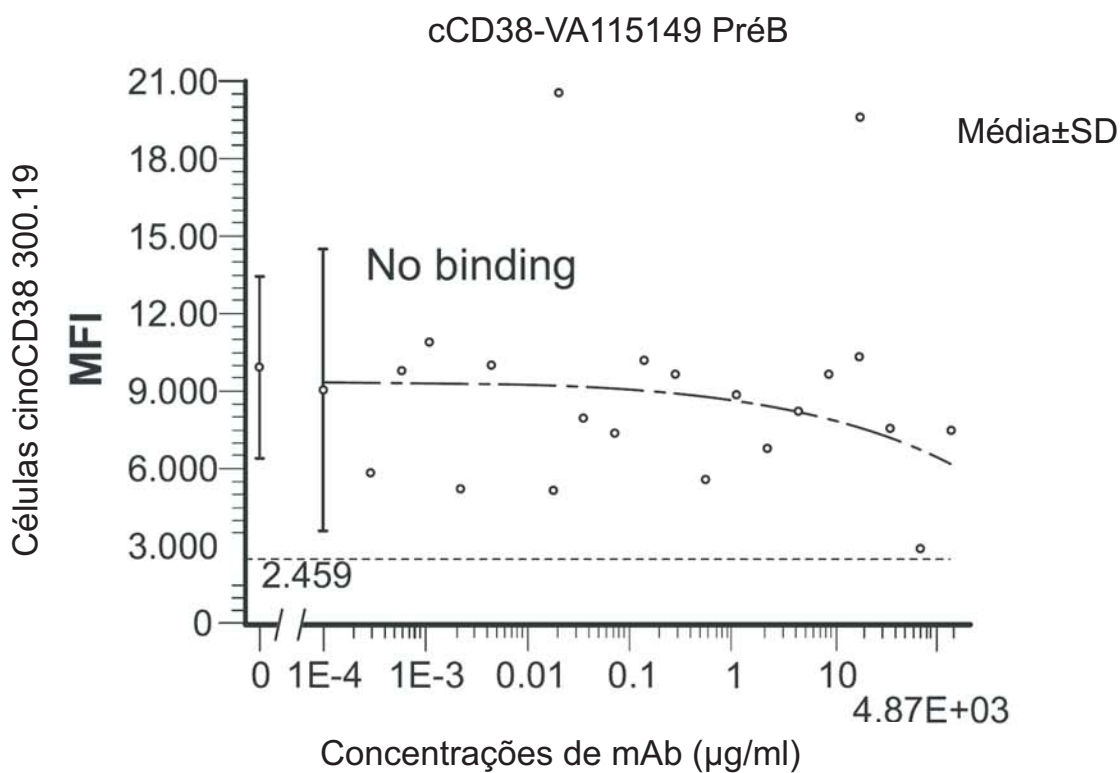


FIG. 6A

VA115149_SB19_ADLE_SABVA6408-6409

7.62E-02 [5.60E-02 ; 1.04E-01] $\mu\text{g/mL}$ CV= 14.8%

**FIG. 6A (Cont.)**

20161028_CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}IgG4

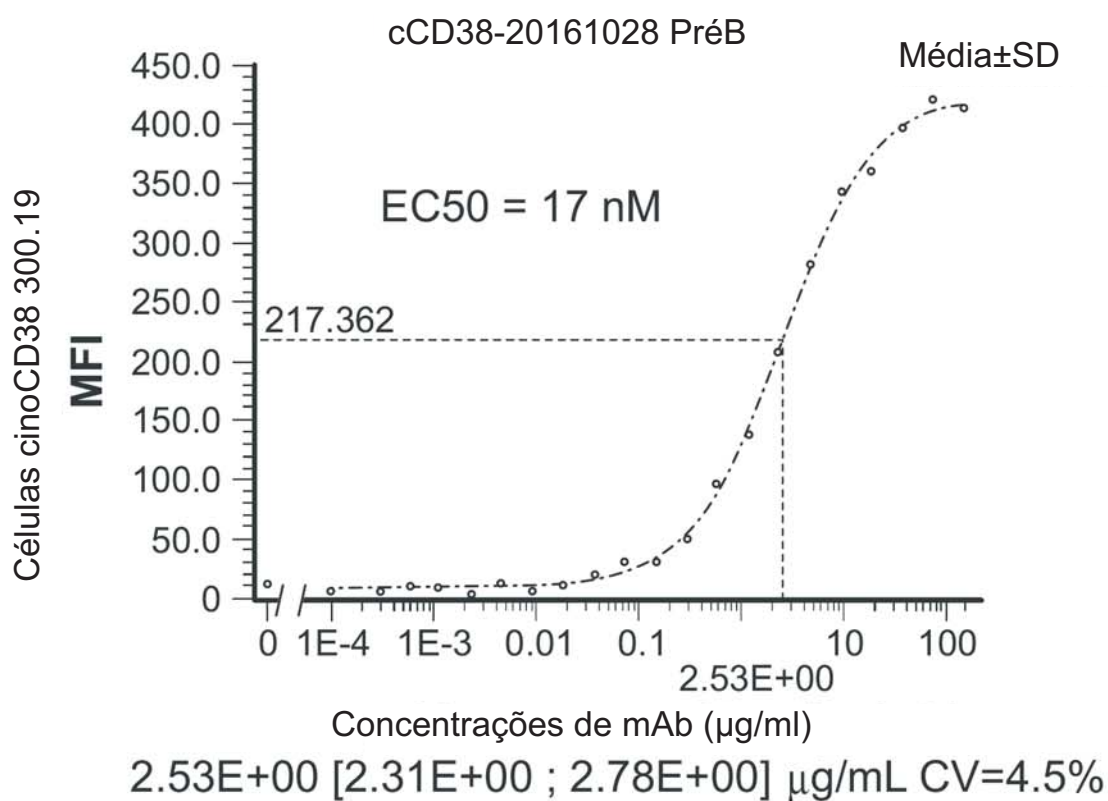
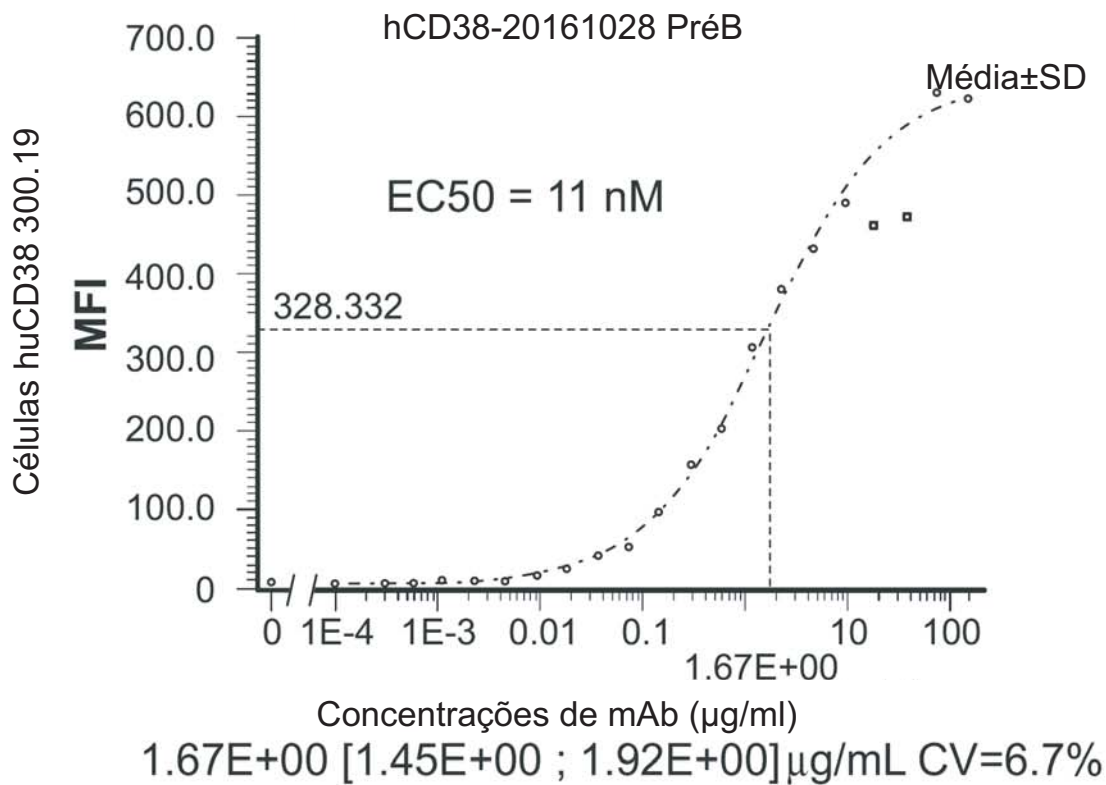


FIG. 6B

20160621_CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}IgG4

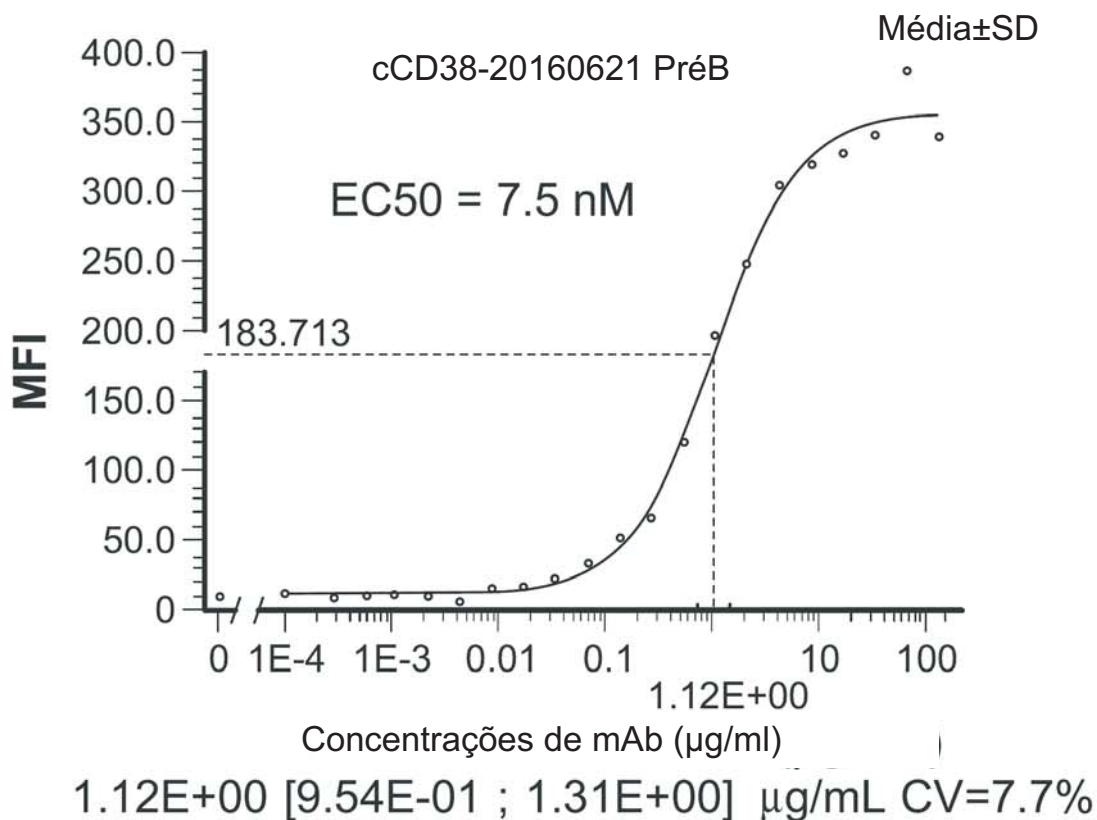
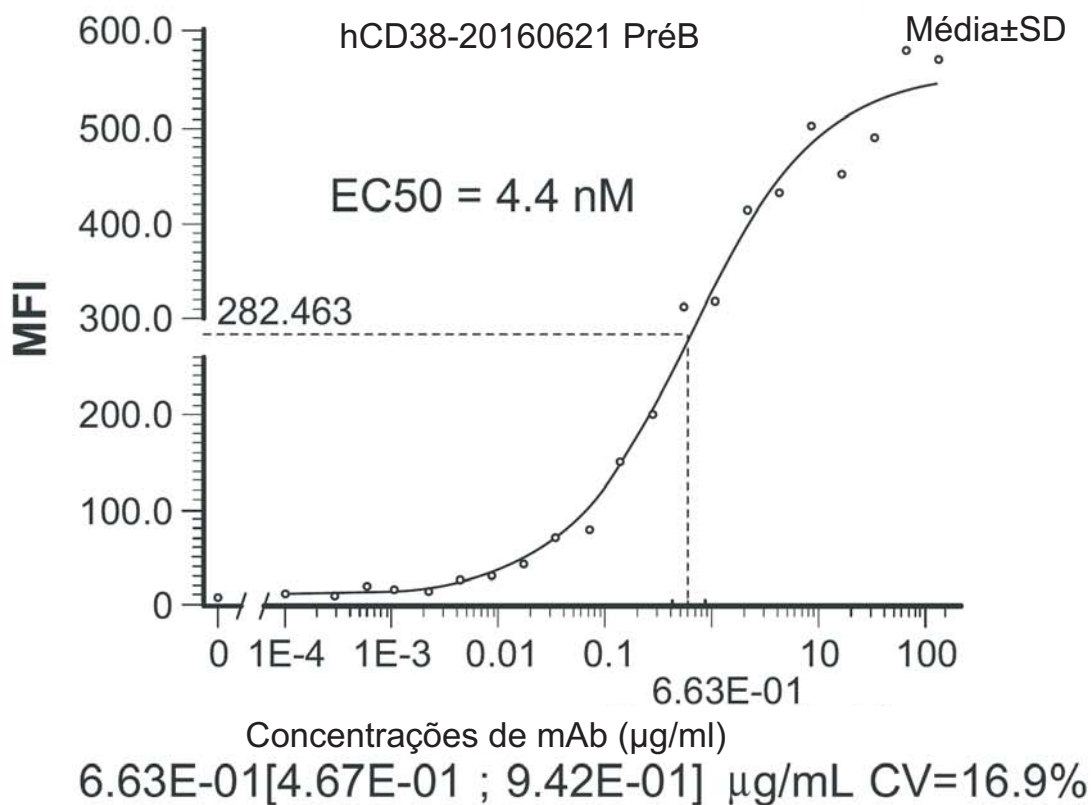
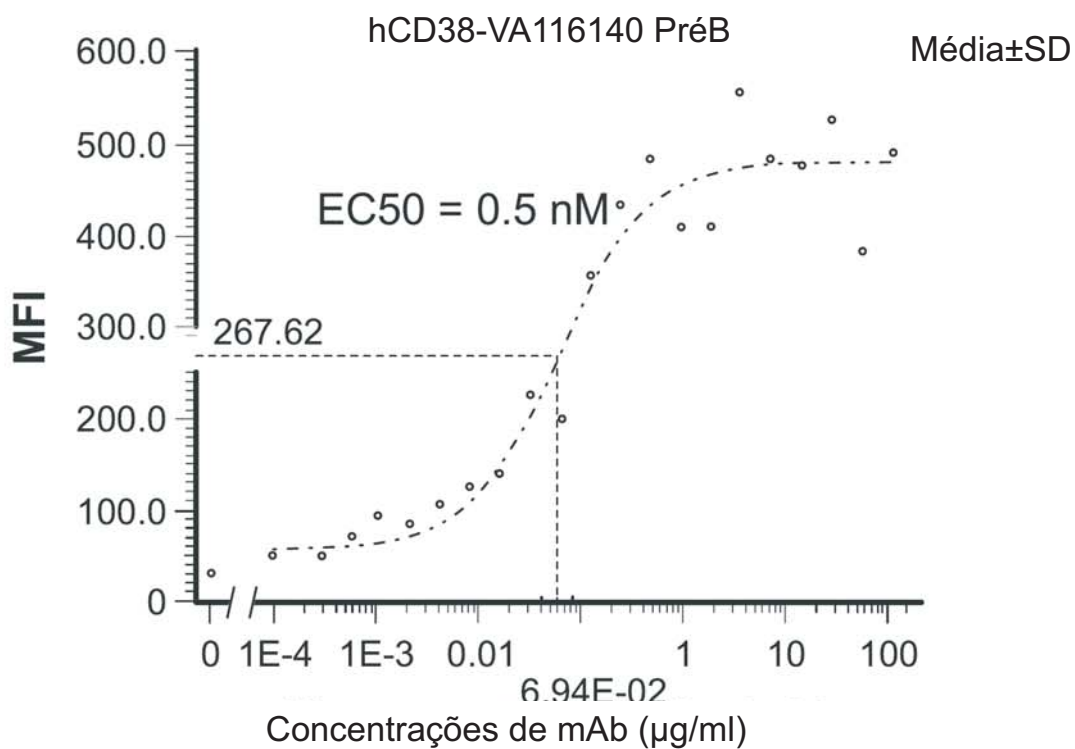
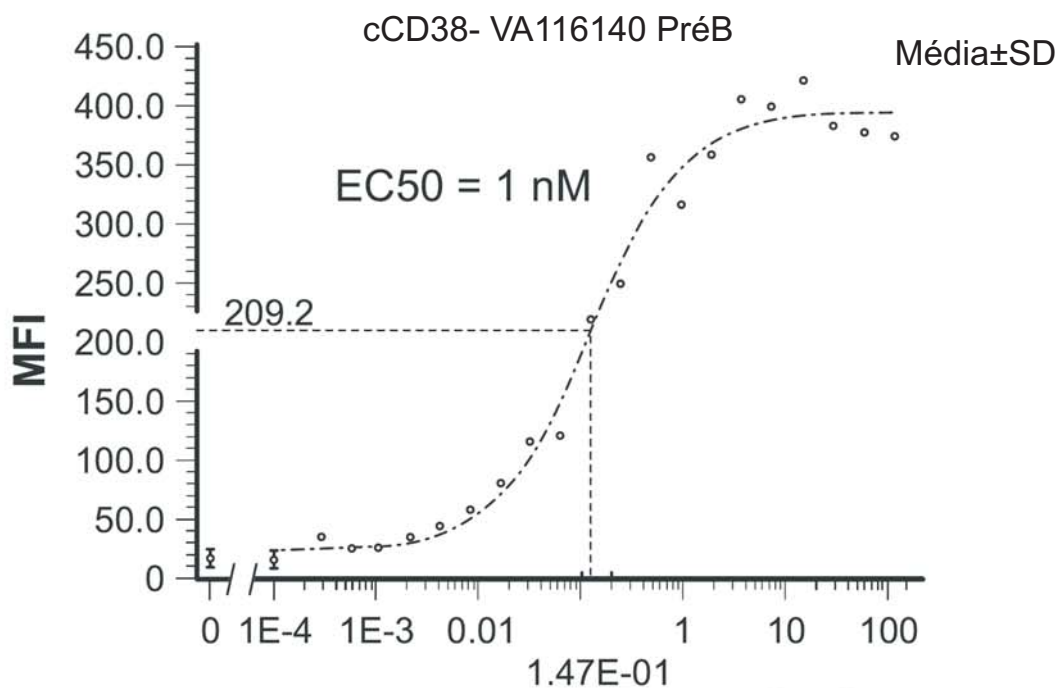


FIG. 6C

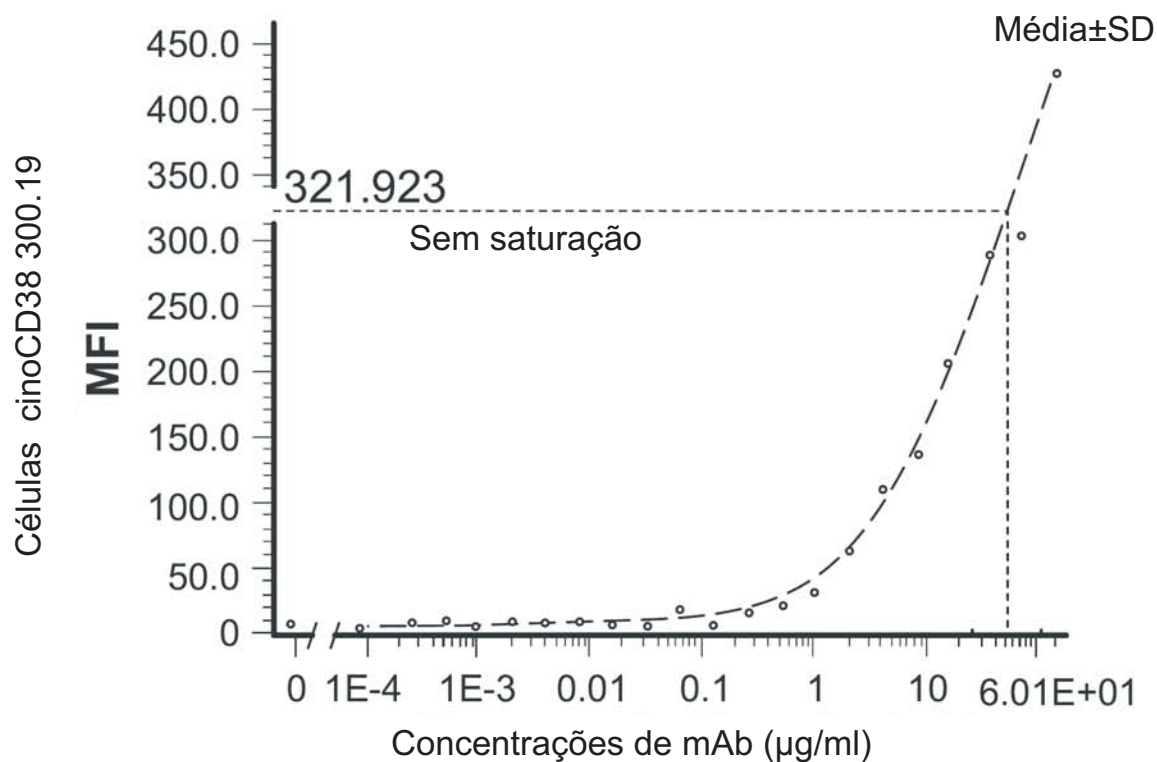
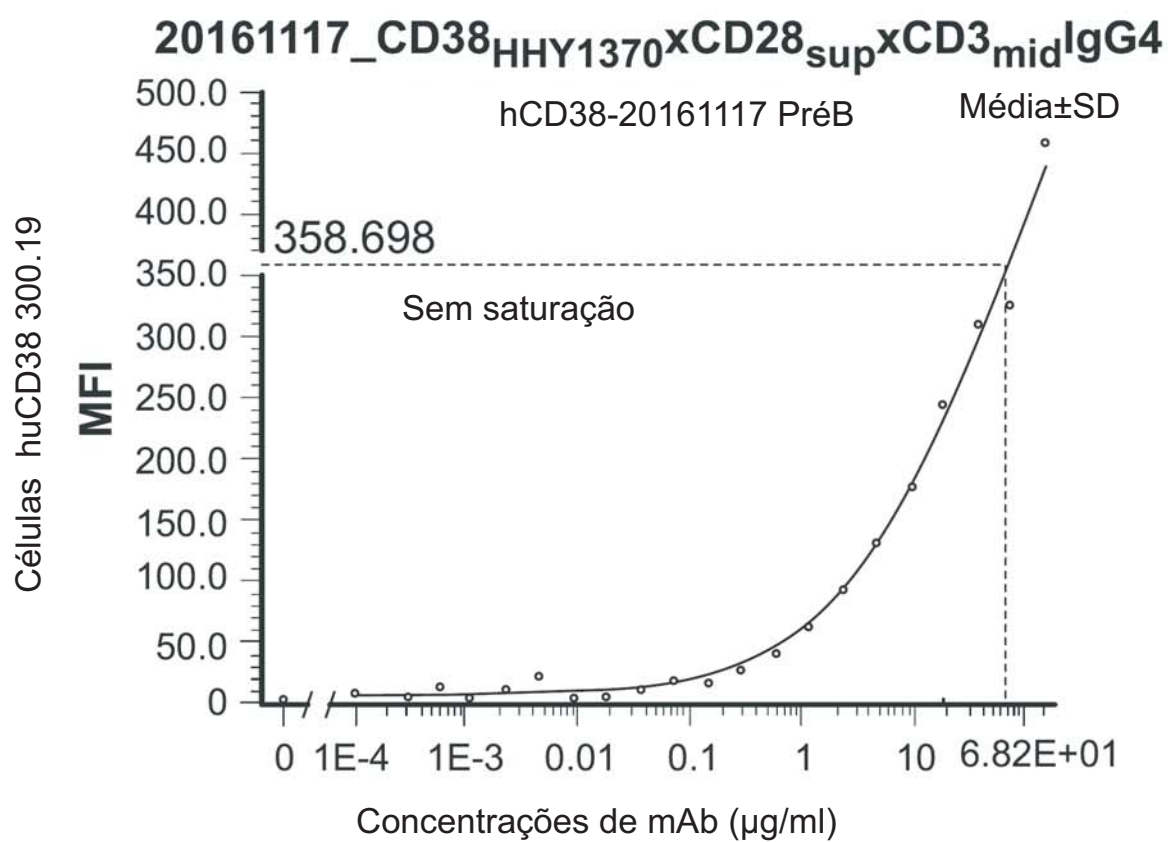
VA116140_sbc_C2CD38-1_VL1-VH1

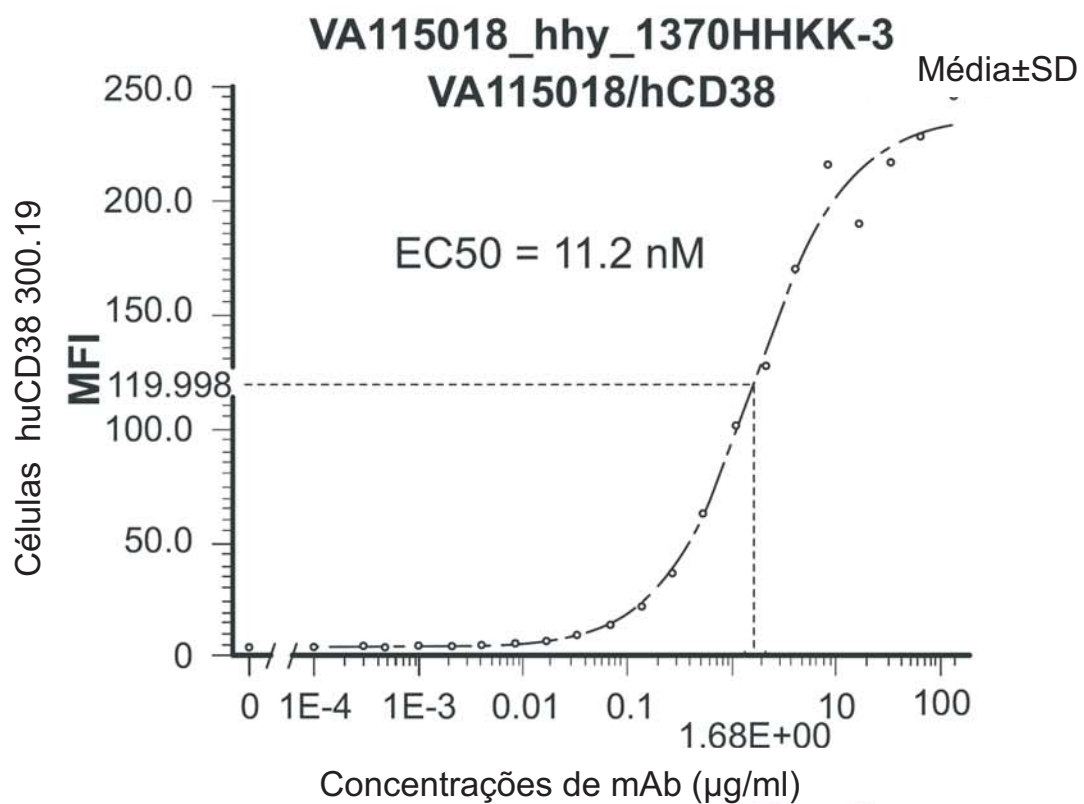
6.94E-02 [3.96E-02 ; 1.21E-01] $\mu\text{g/mL}$ CV=27.3%



1.47E-01 [1.09E-01 ; 1.98E-01] $\mu\text{g/mL}$ CV=14.3%

FIG. 6D

**FIG. 6E**



1.68E+00 [1.34E+00 ; 2.10E+00] $\mu\text{g/mL}$ CV=10.7%

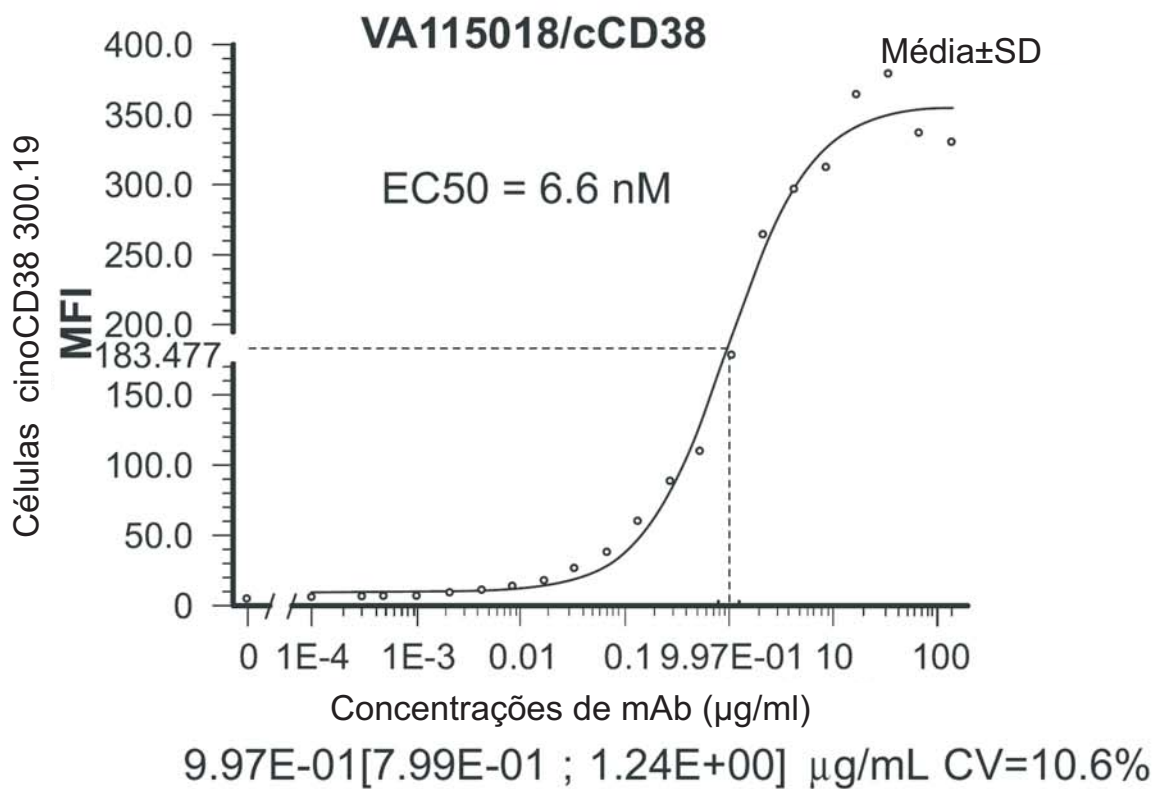


FIG. 6E (Cont.)

TsAbs	¹ Valor de KD contra proteína rec. por SPR (nM)	² Valor de KD aparente contra células rec. por FACS (nM)
CD38 _{SB19} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	2	4
CD38 _{VH1} CD28 _{sup} CD3 _{mid/low}	4/6	11
CD38 _{VH1} CD28 _{cvn} CD3 _{mid/low}	4/6	4.4
CD38 _{HHY1370} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	1	Nenhum valor de EC50 preciso pôde ser estimado (sem saturação)

FIG. 6F

20161209_ΔCD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}IgG4

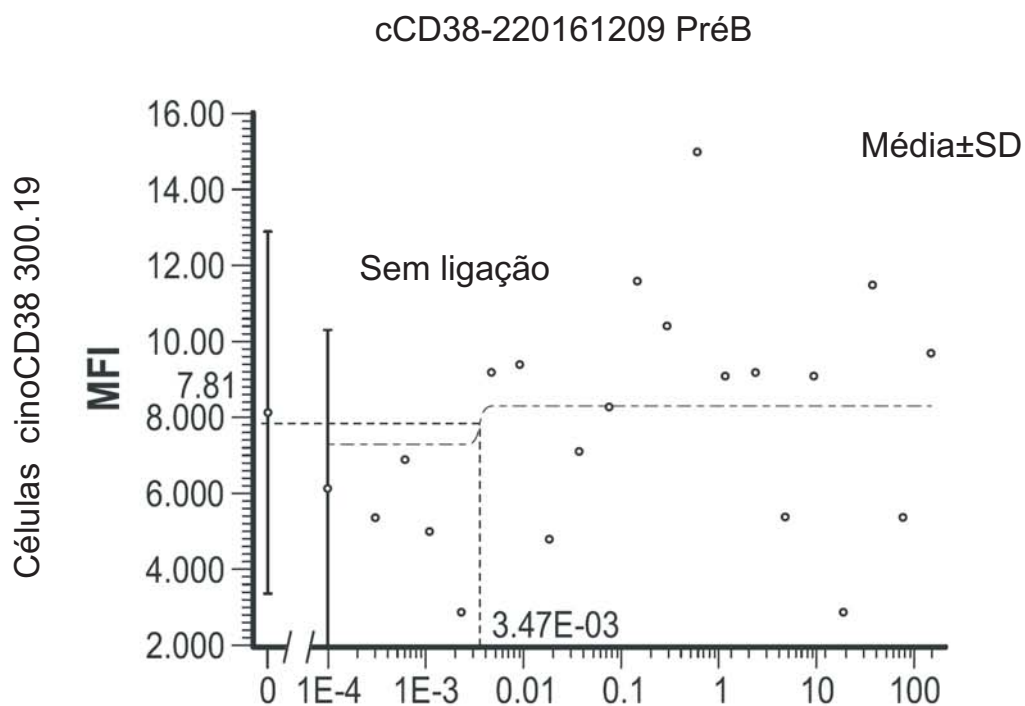
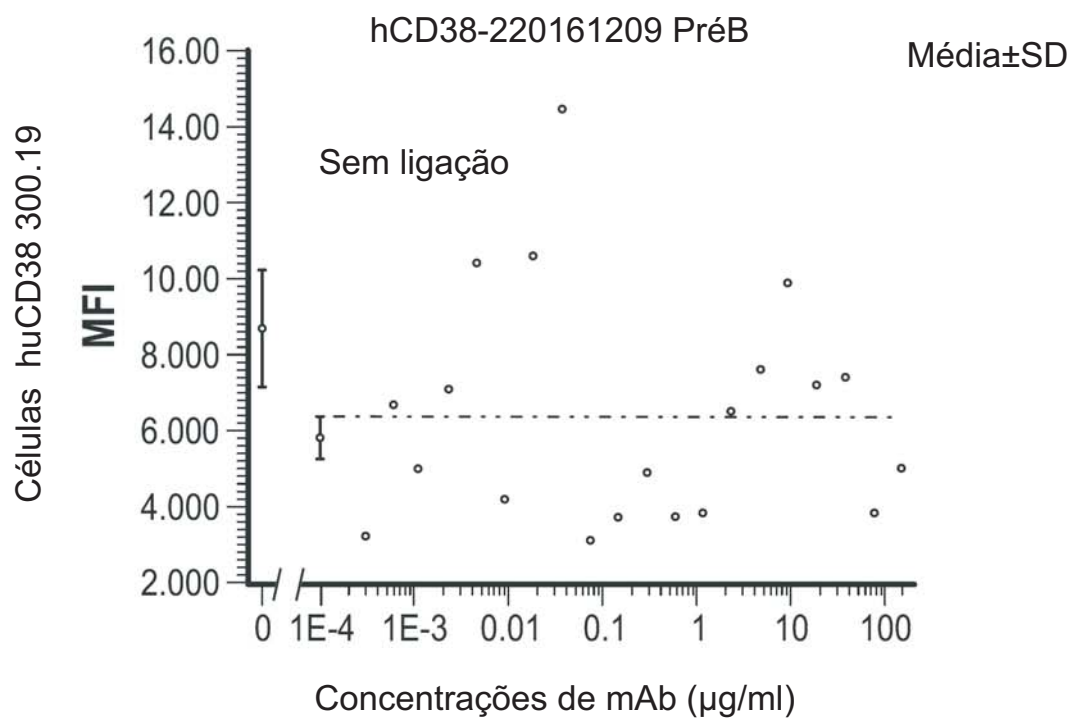


FIG. 6G

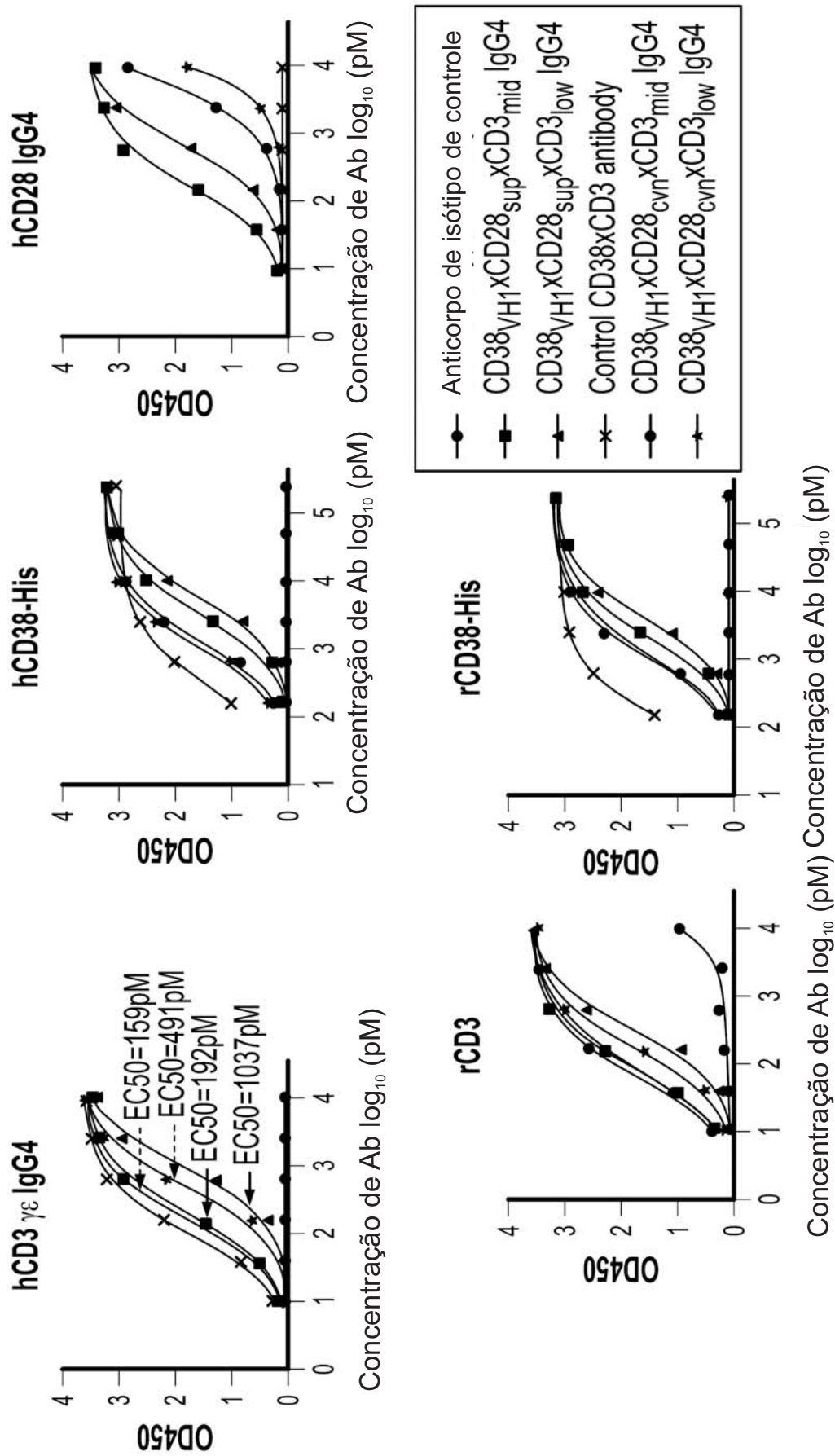


FIG. 7A

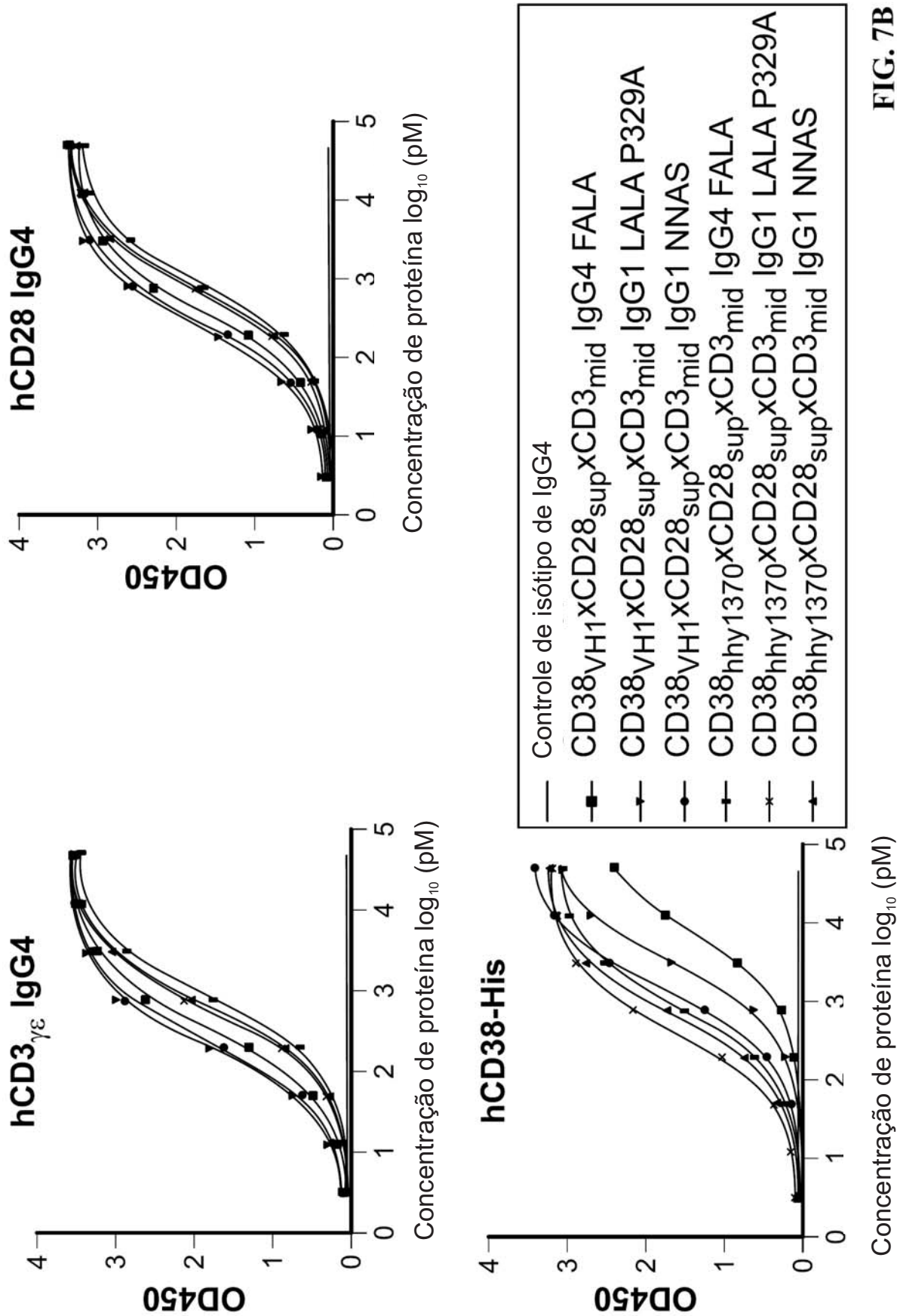


FIG. 7B

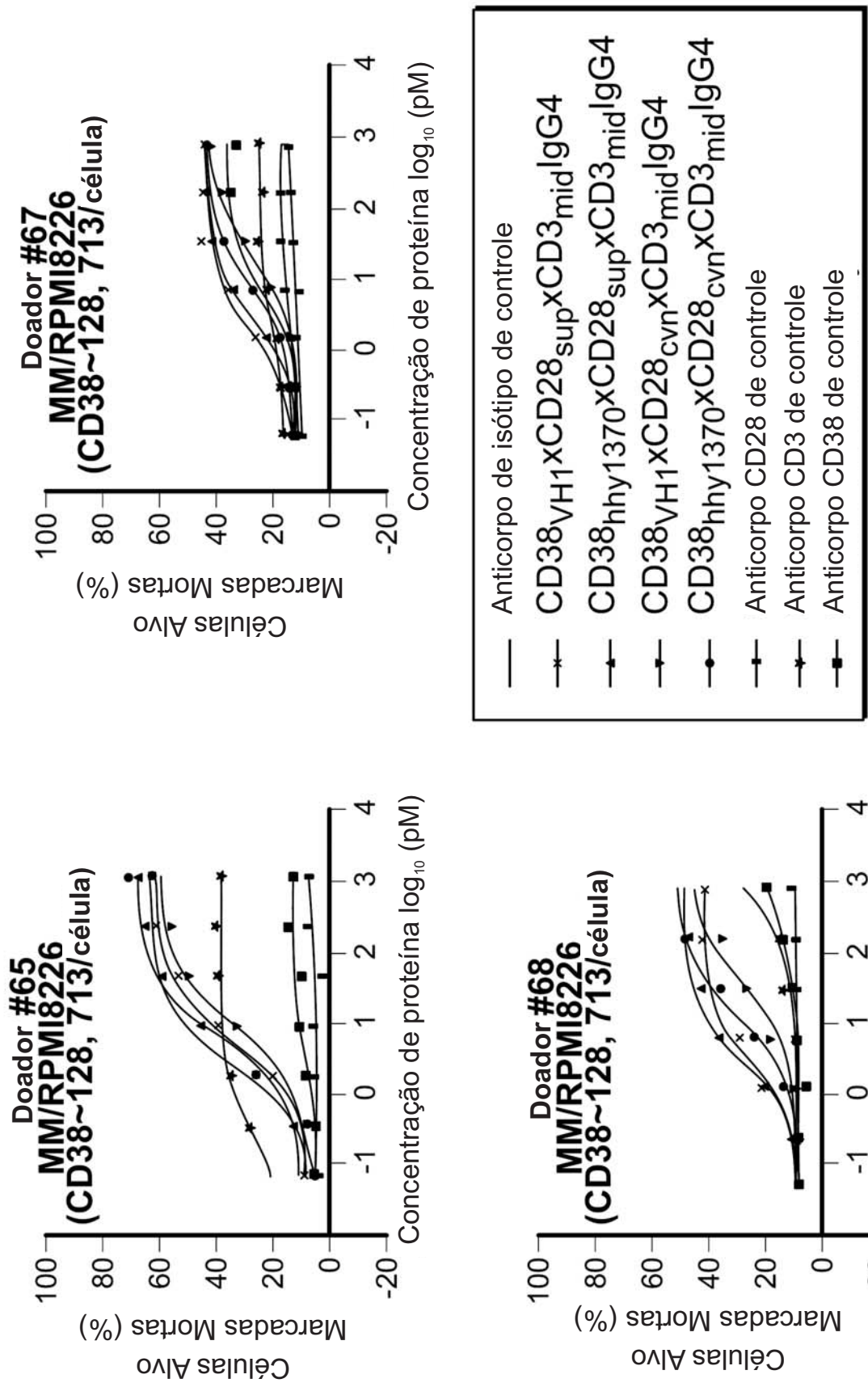


FIG. 8A

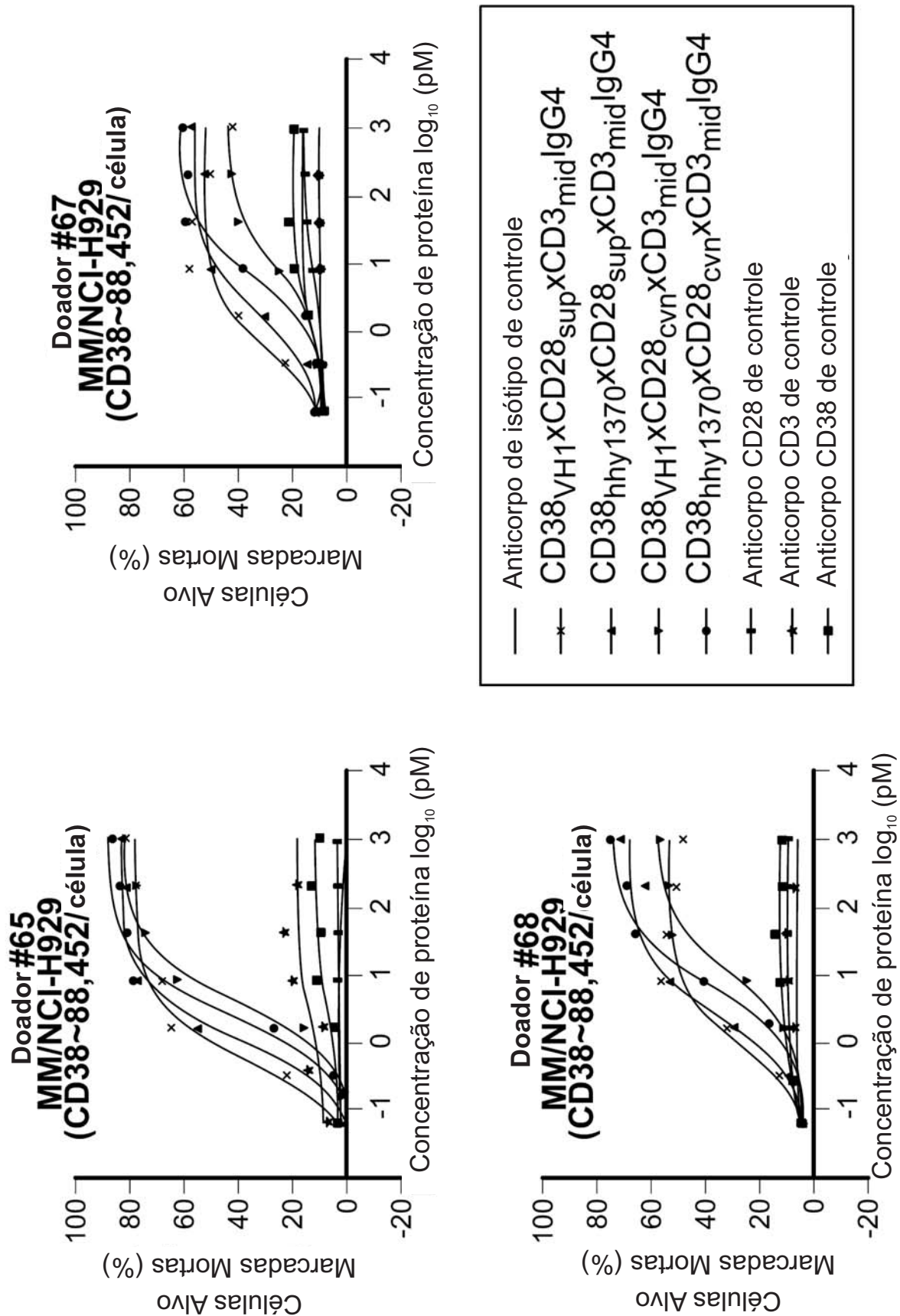


FIG. 8B

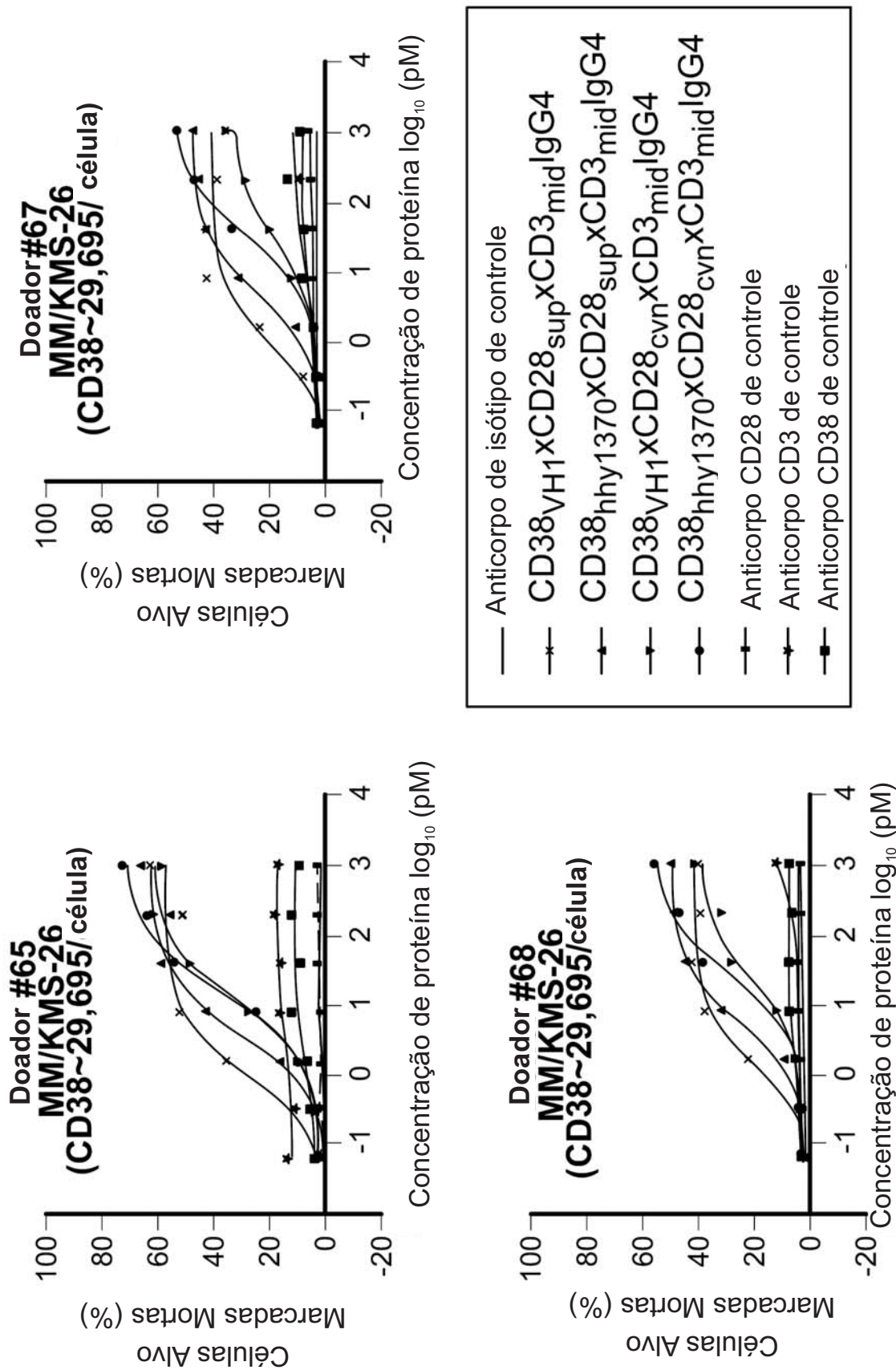
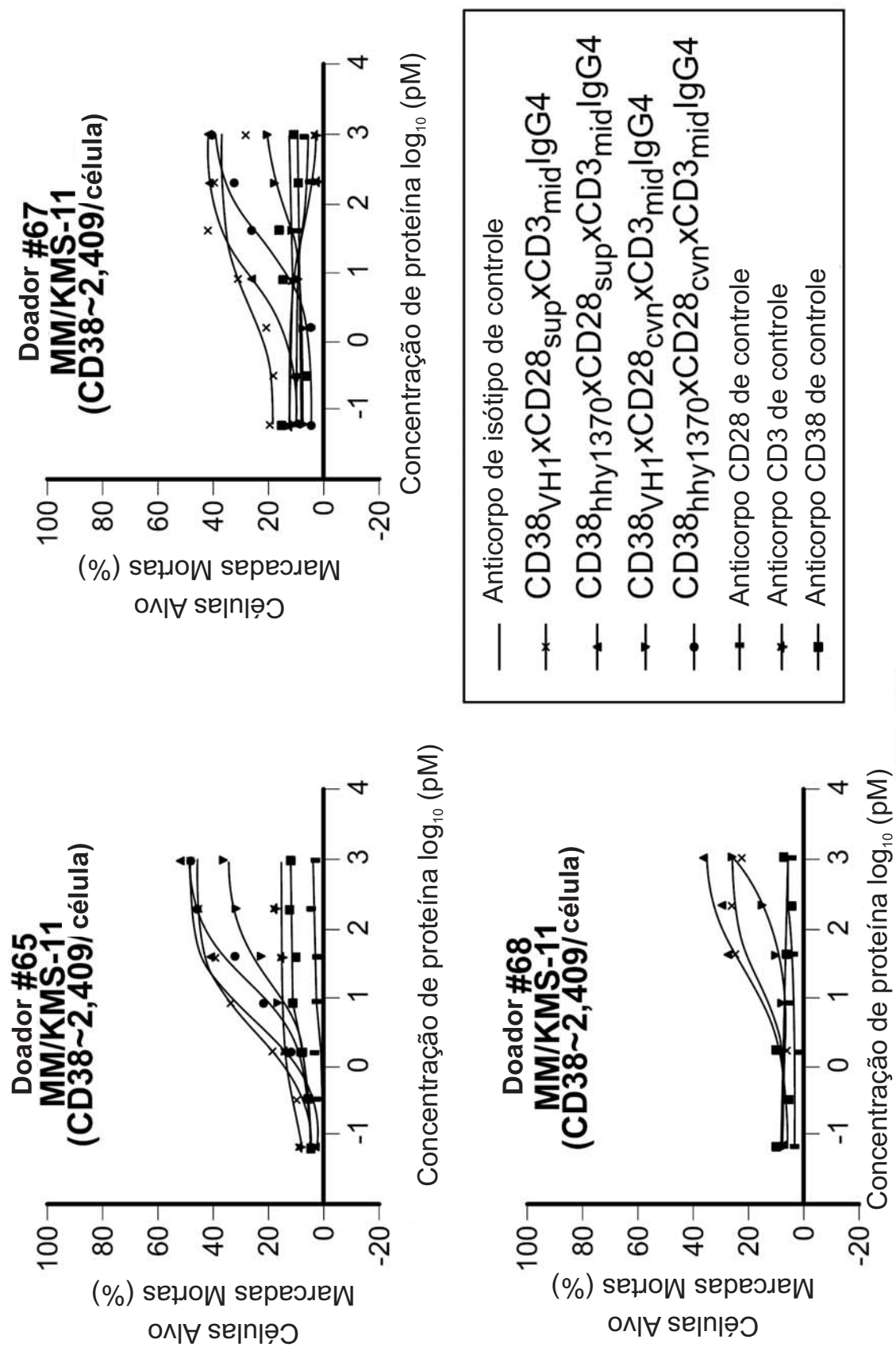
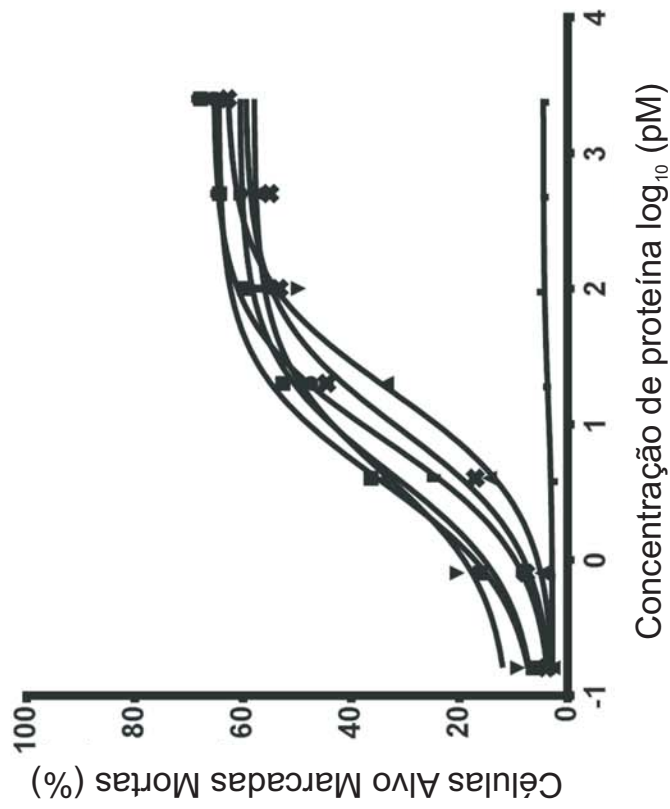


FIG. 8C



Doador 1: KP50901



Doador 2: KP50904

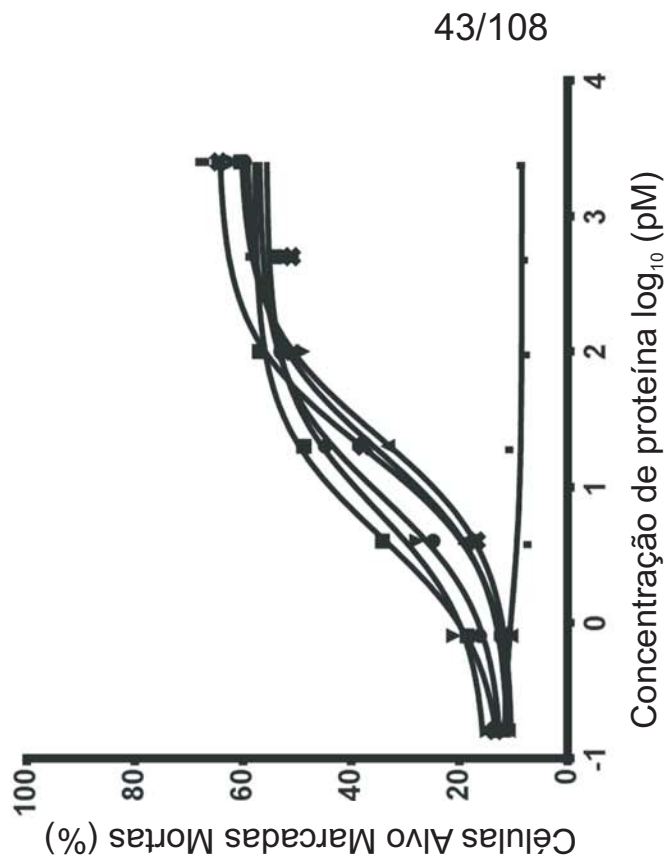
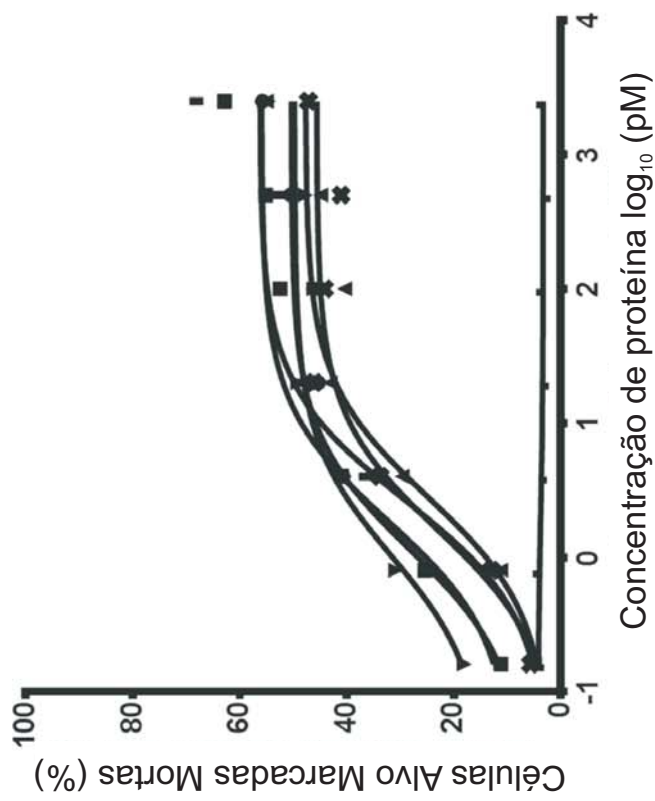


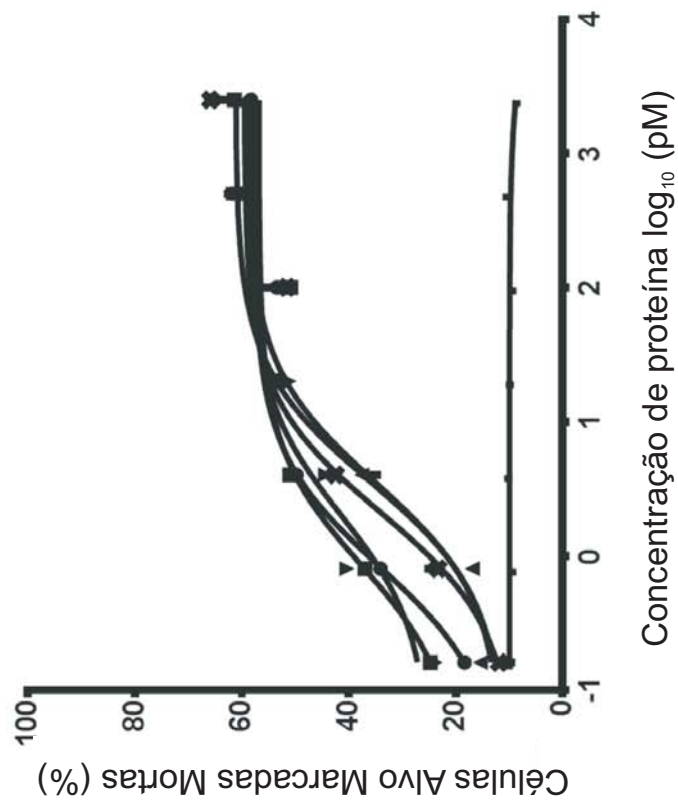
FIG. 8E

- Controle de isótipo de IgG4
- CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4 FALA
- ▼ CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 LALA P329A
- CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 NNAS
- CD38_{hhv1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4 FALA
- CD38_{hhv1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 LALA P329A
- ▼ CD38_{hhv1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 NNAS

Doador 1: KP50901



Doador 2: KP50904



- Controle de isótipo de IgG4
- CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4 FALA
- ▲ CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 LALA P329A
- CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 NNAS
- CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4 FALA
- ◆ CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 LALA P329A
- CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} IgG1 NNAS

FIG. 8F

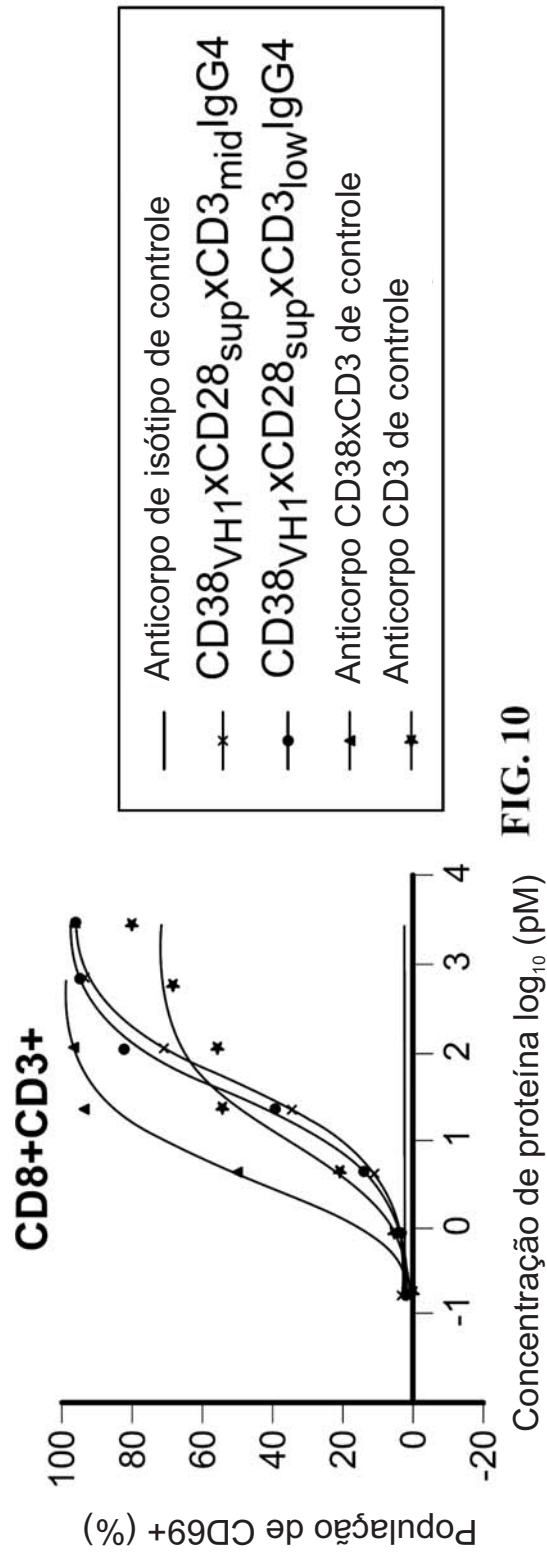
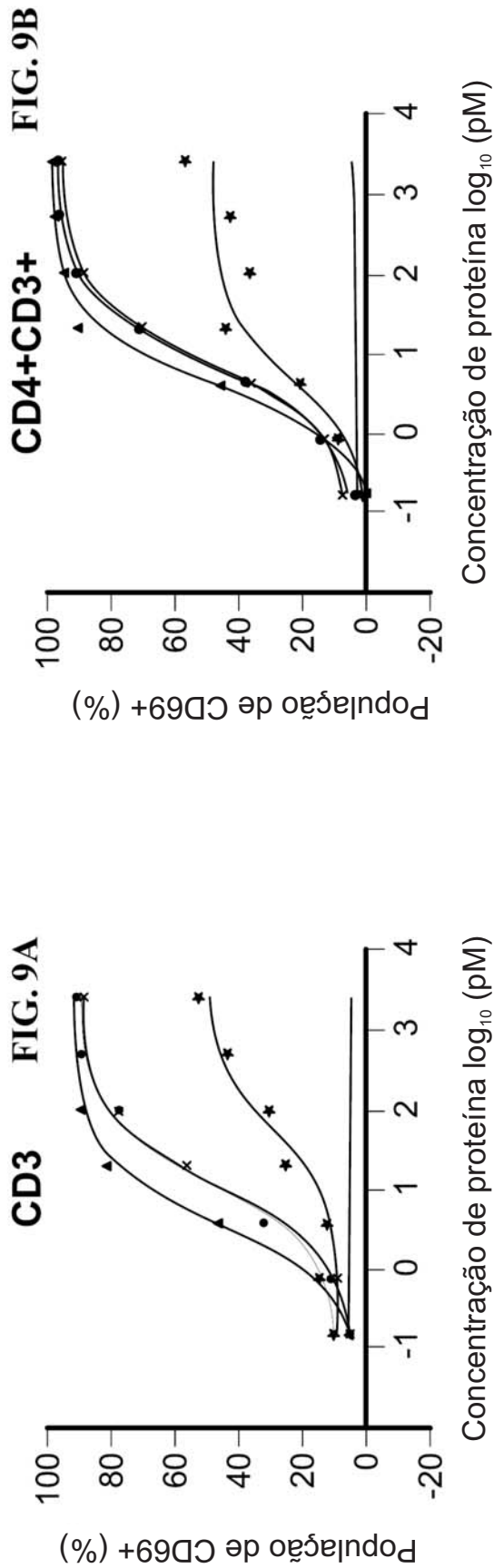


FIG. 11A

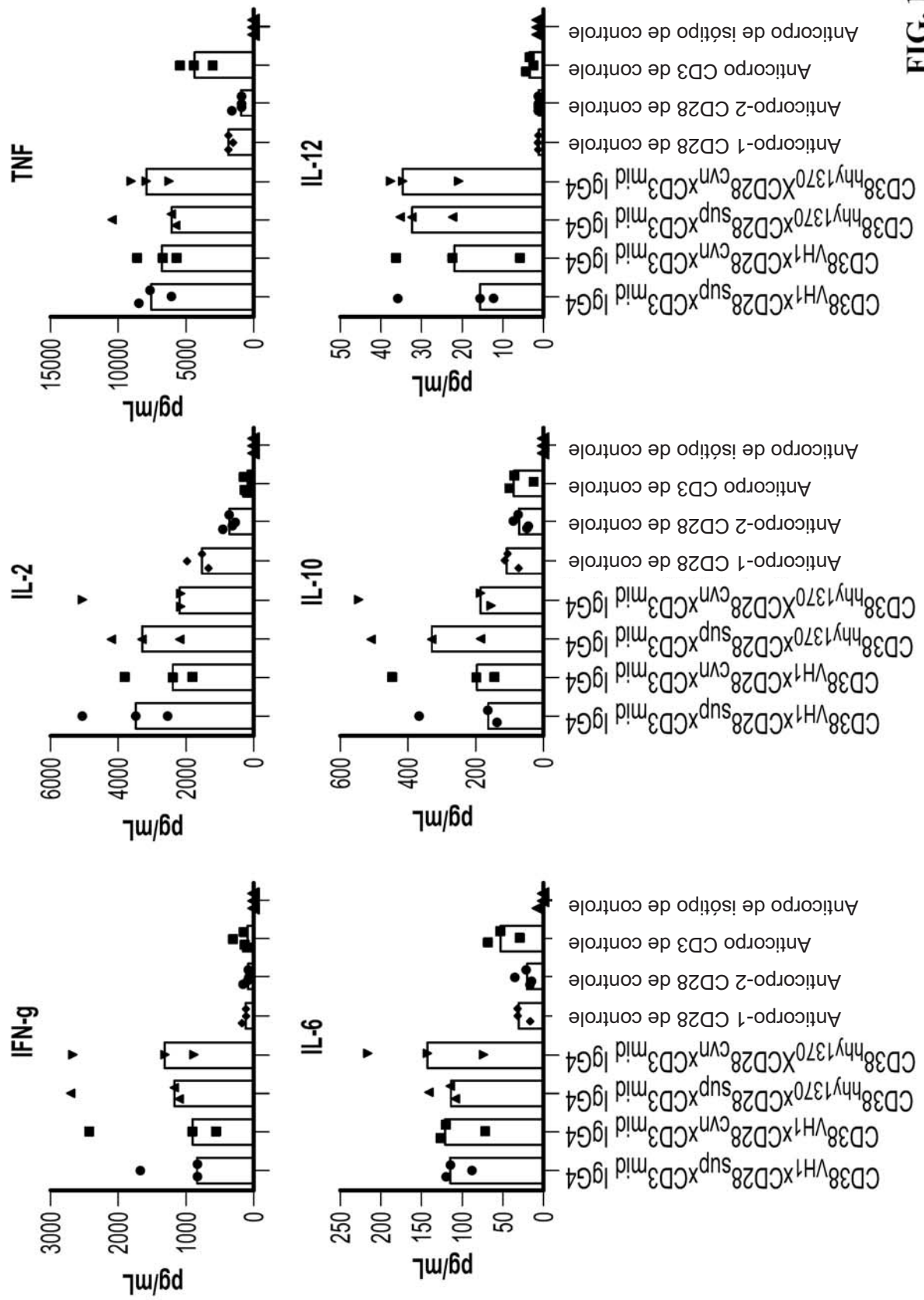
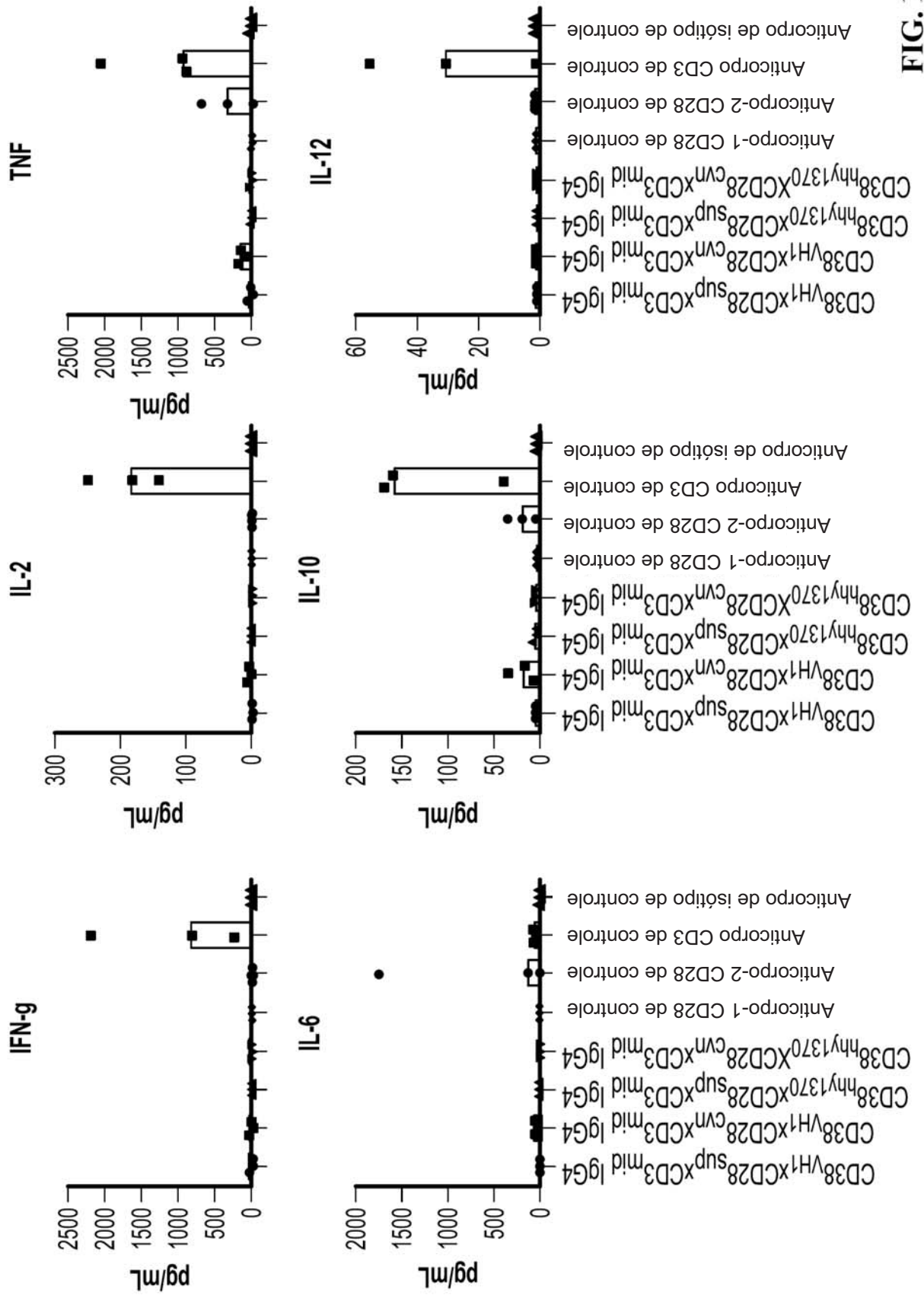


FIG. 11B



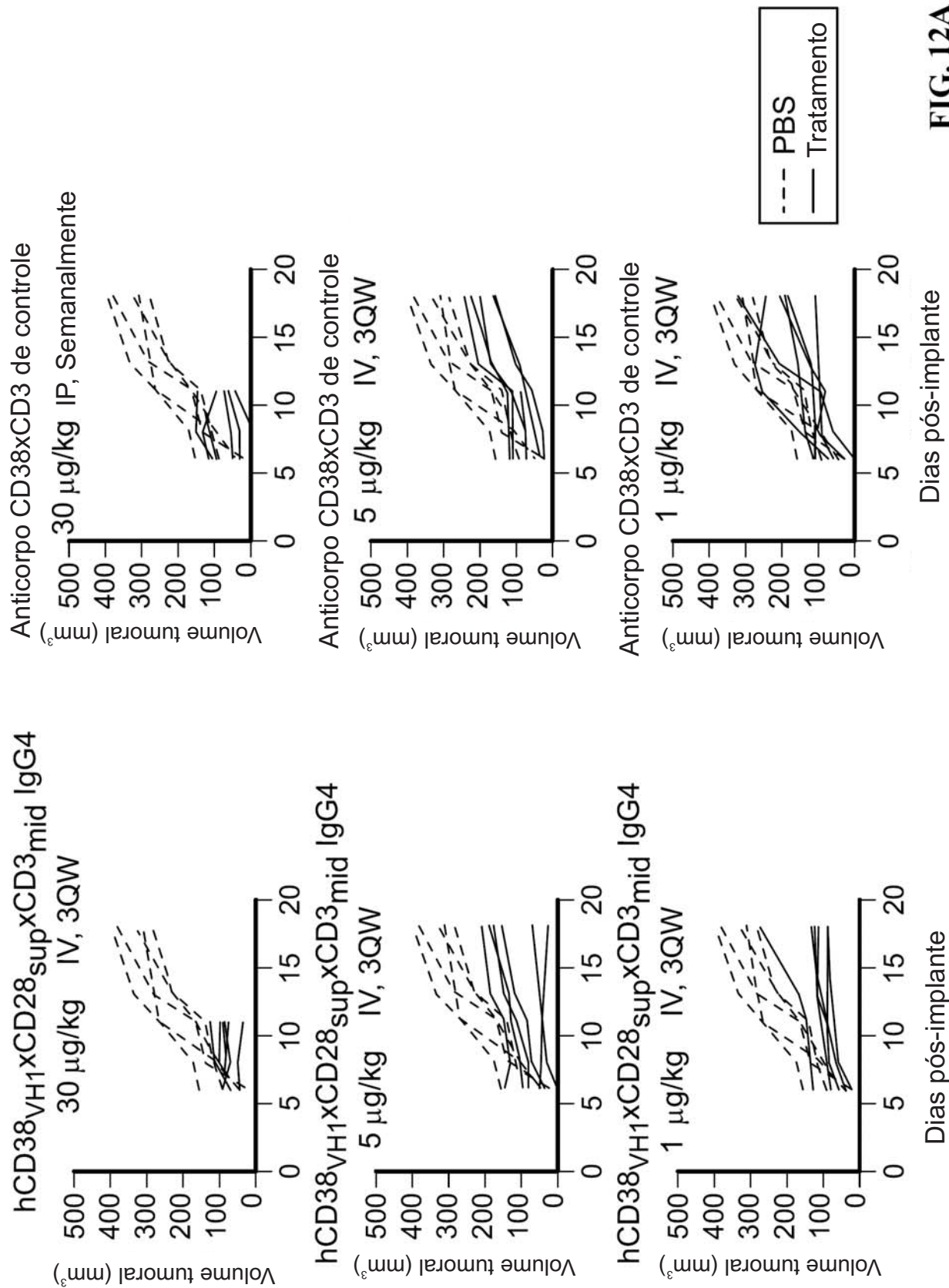


FIG. 12A

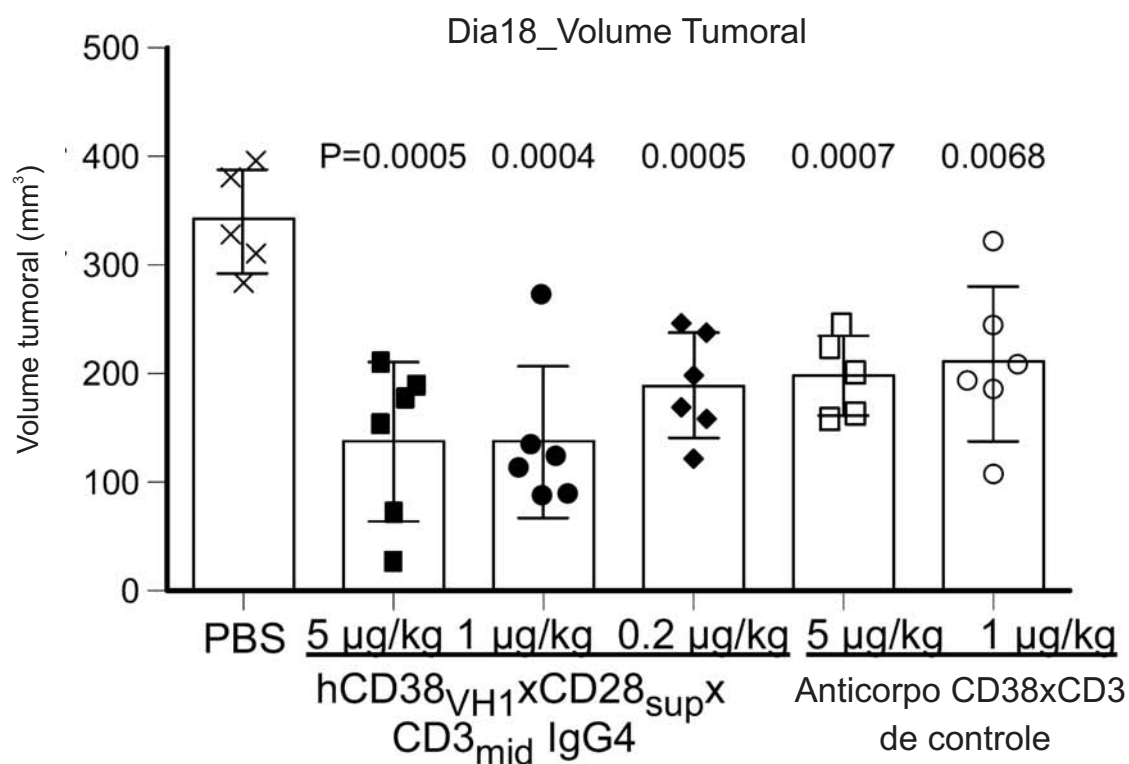


FIG. 12B

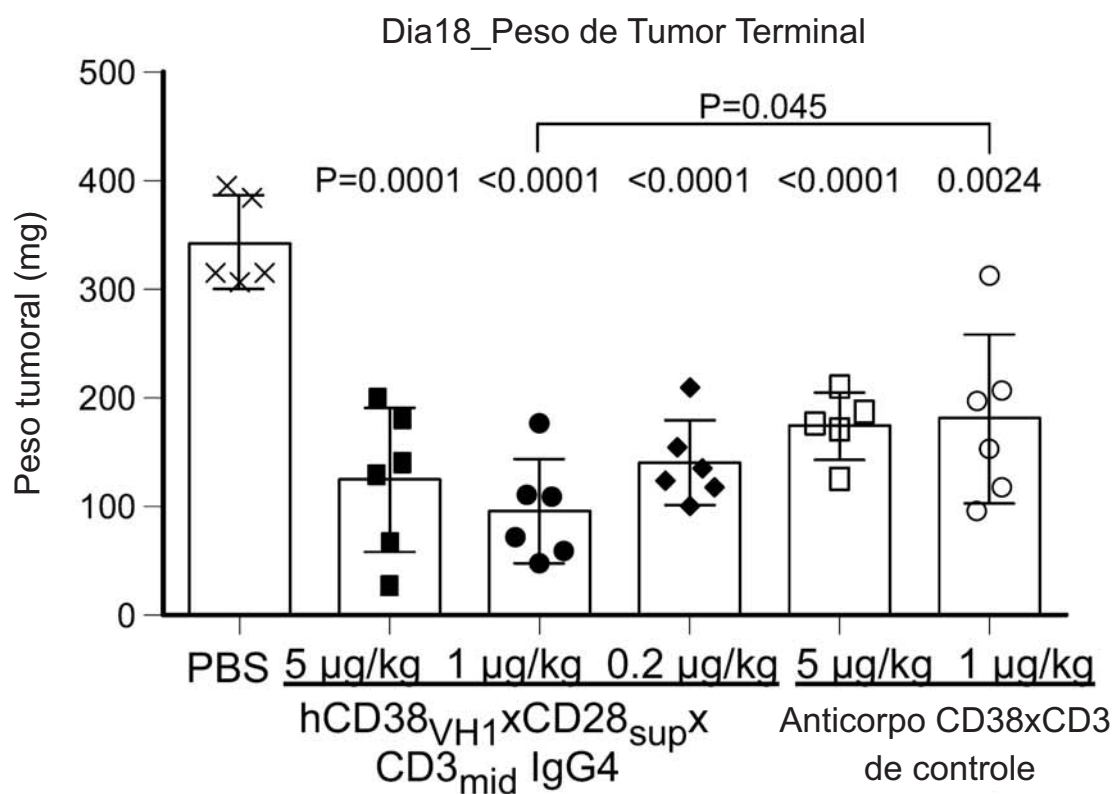
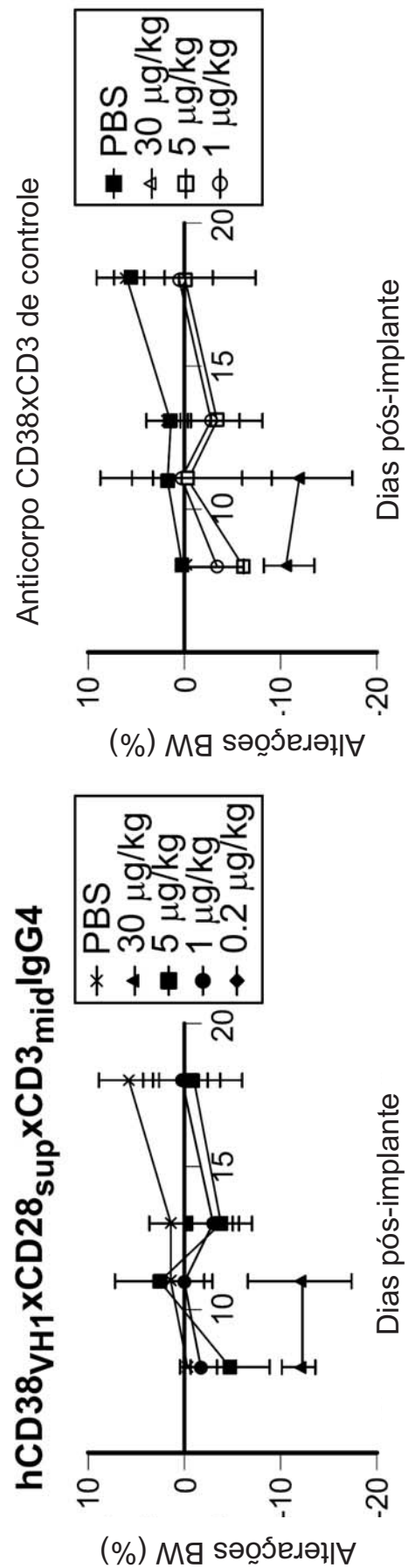
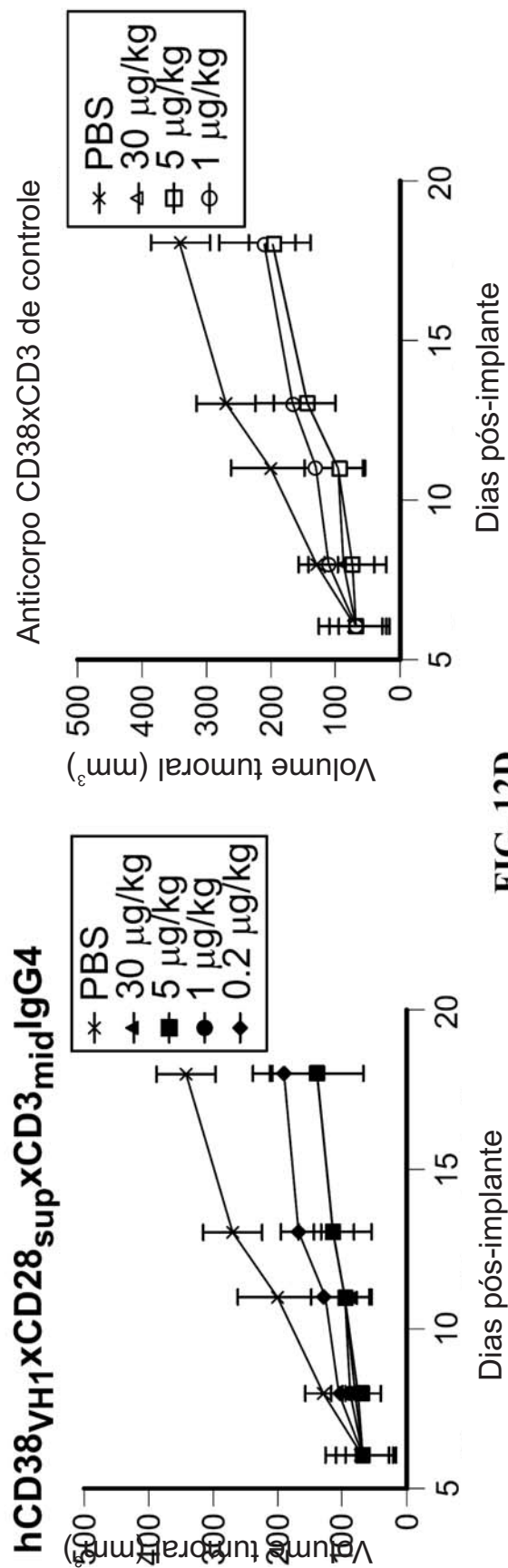


FIG. 12C



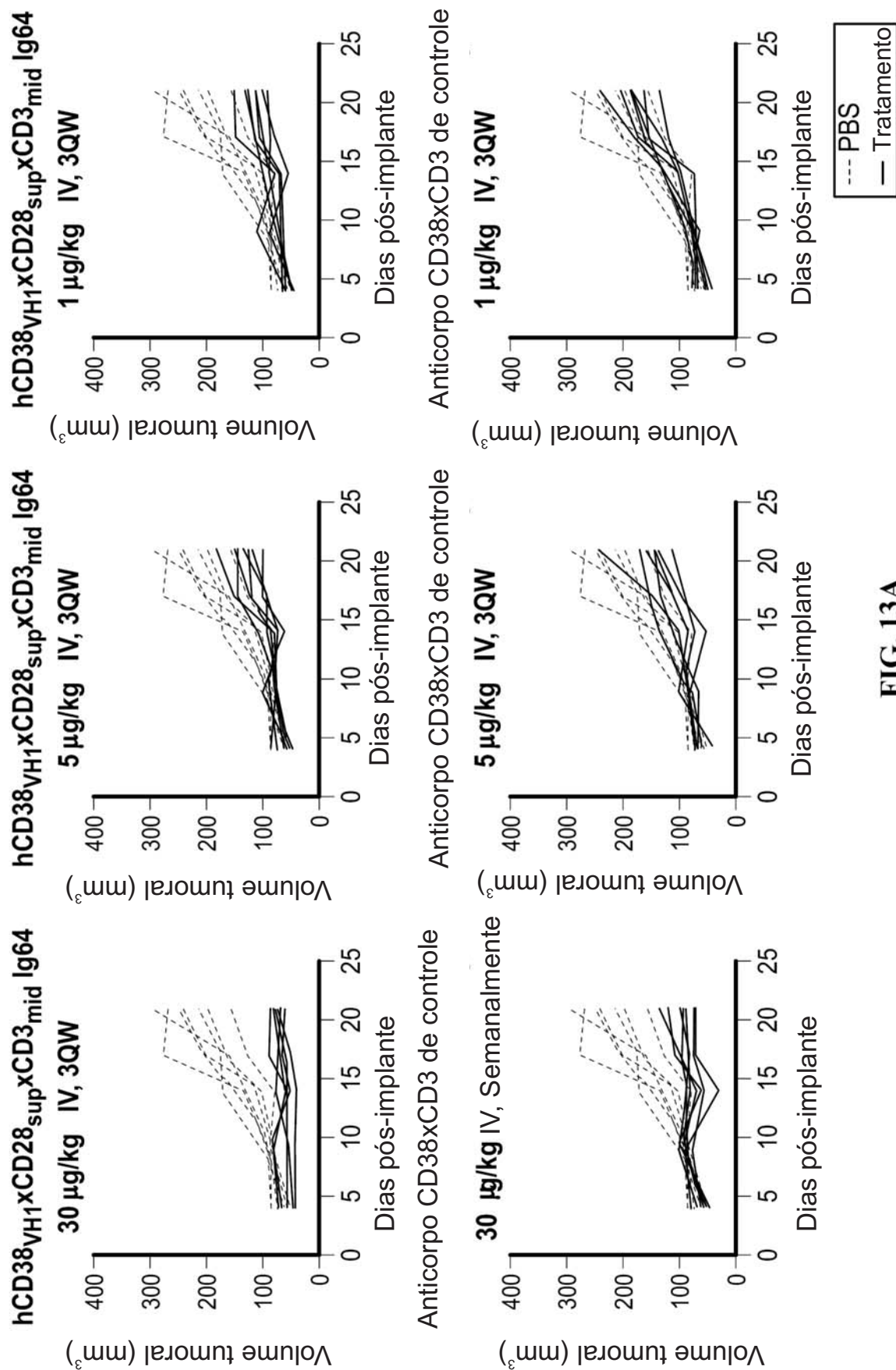


FIG. 13A

52/108

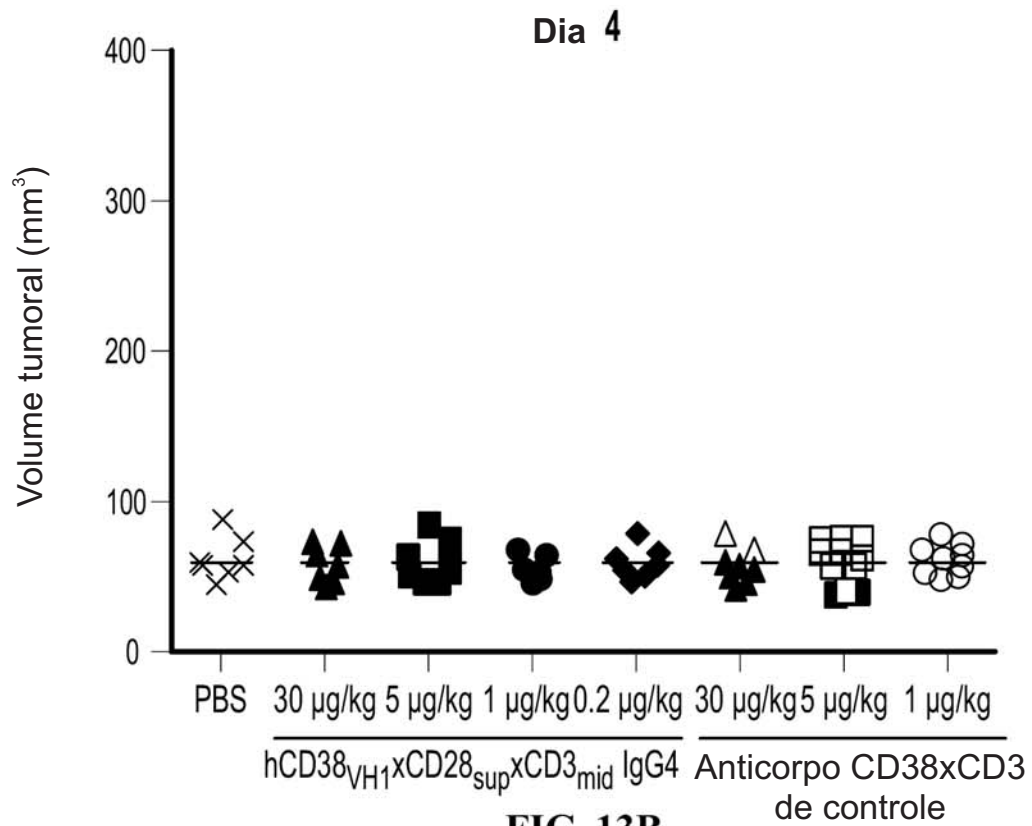


FIG. 13B

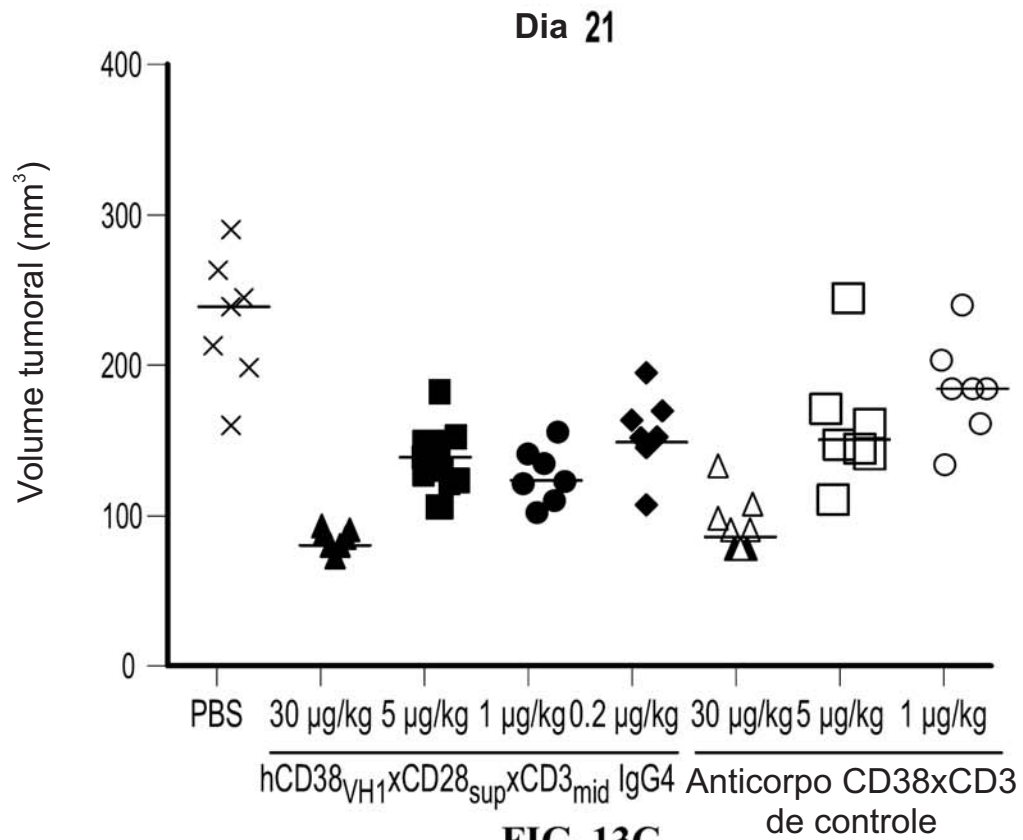


FIG. 13C

Dia21_Tamanho Tumoral

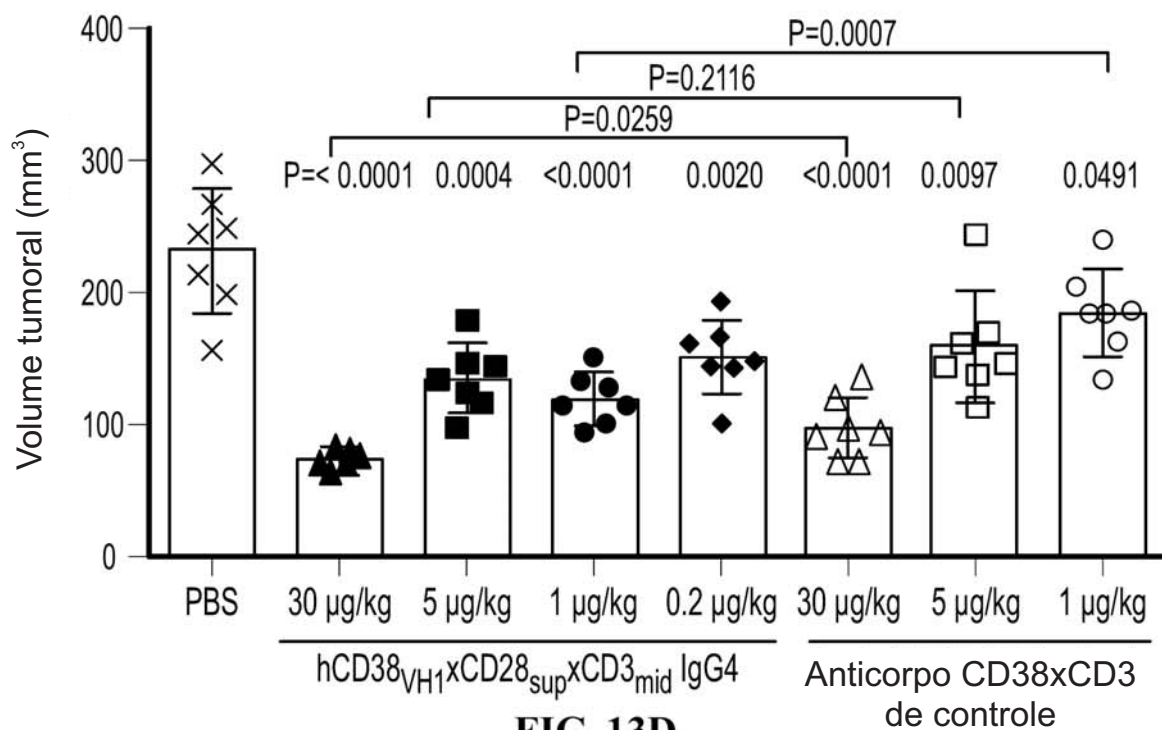


FIG. 13D

Dia22_Peso de Tumor Terminal

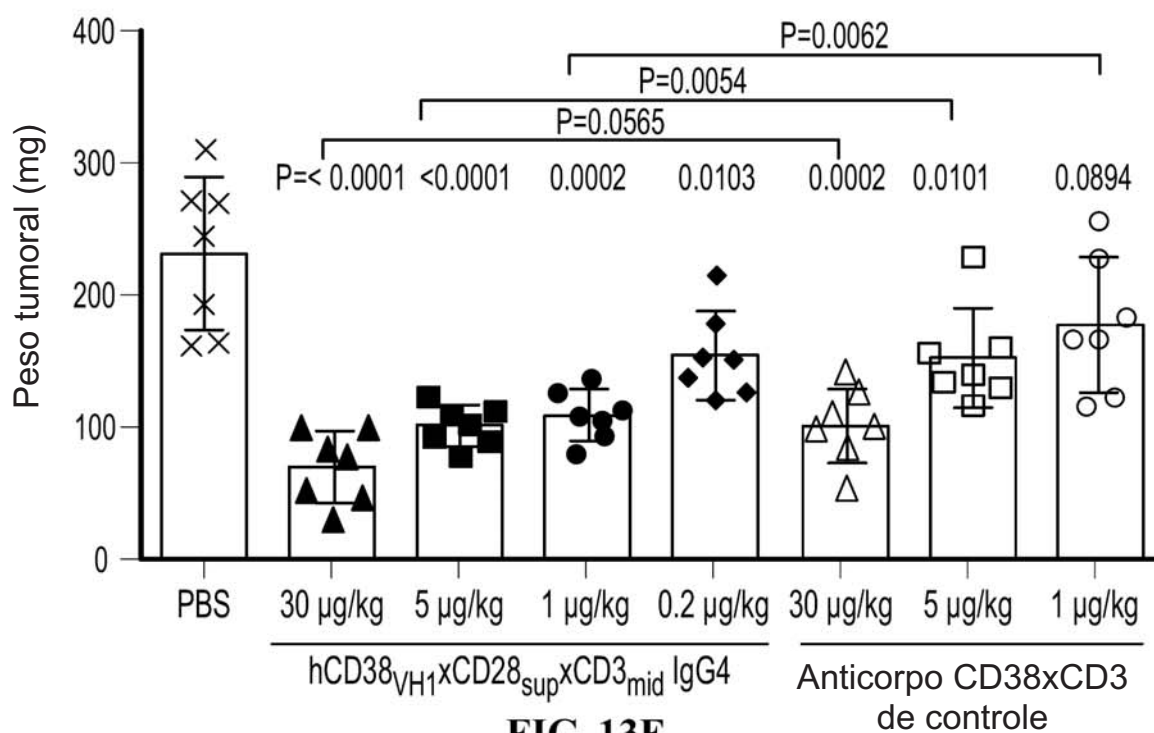


FIG. 13E

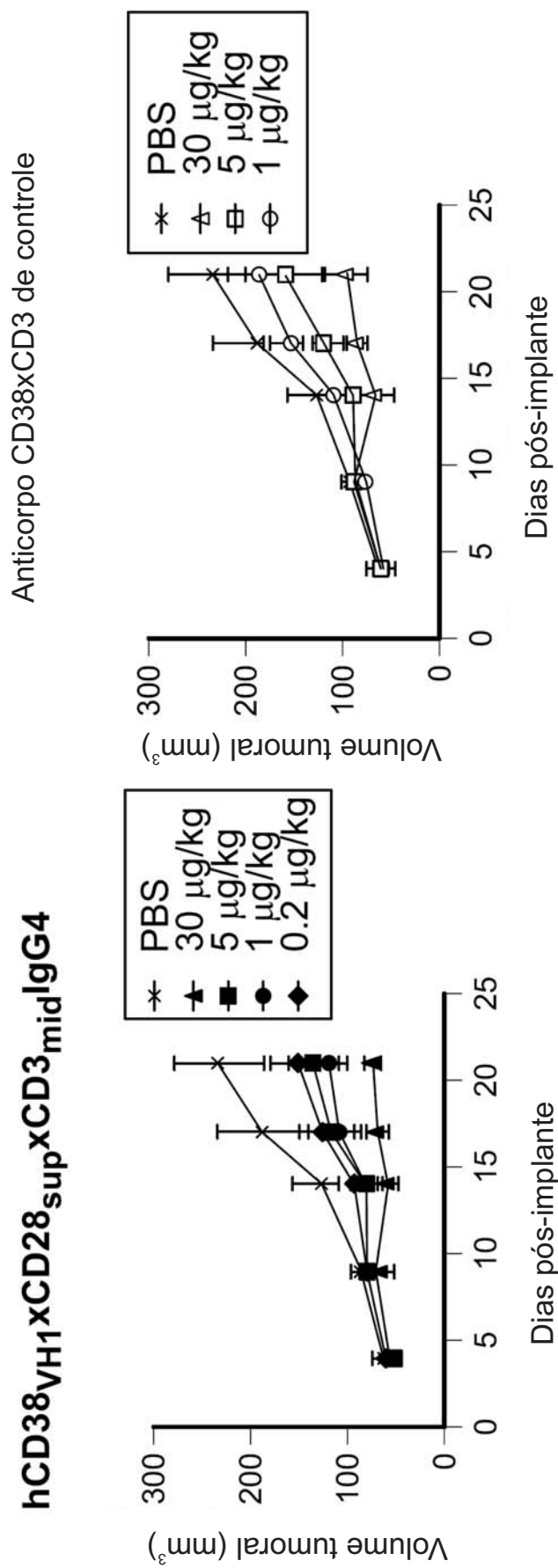


FIG. 13F

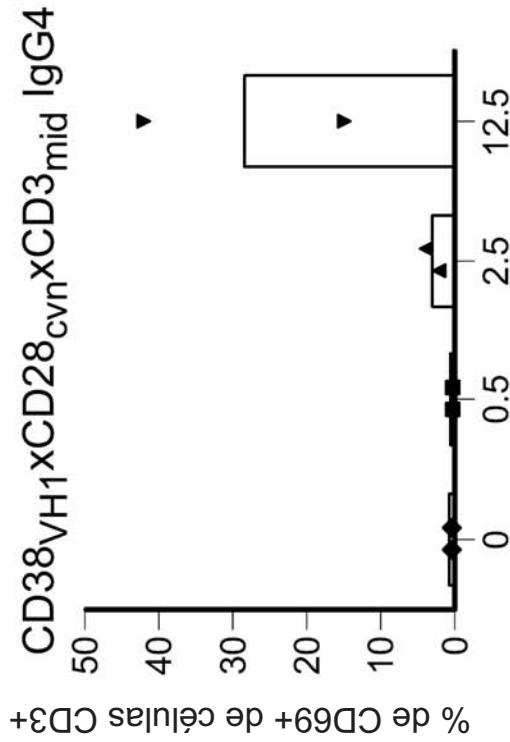


FIG. 14B

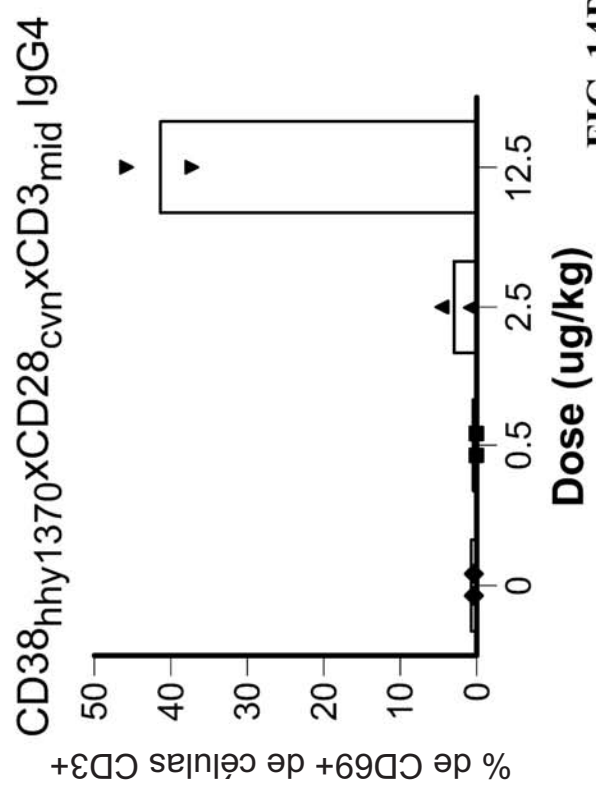


FIG. 14D

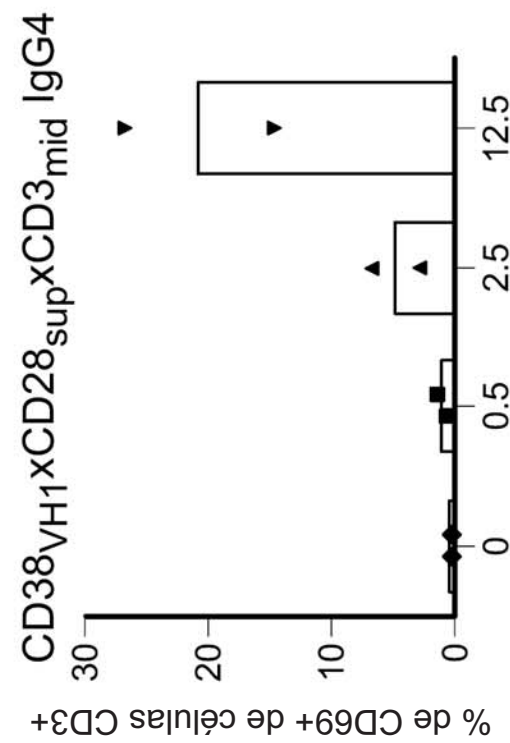


FIG. 14A

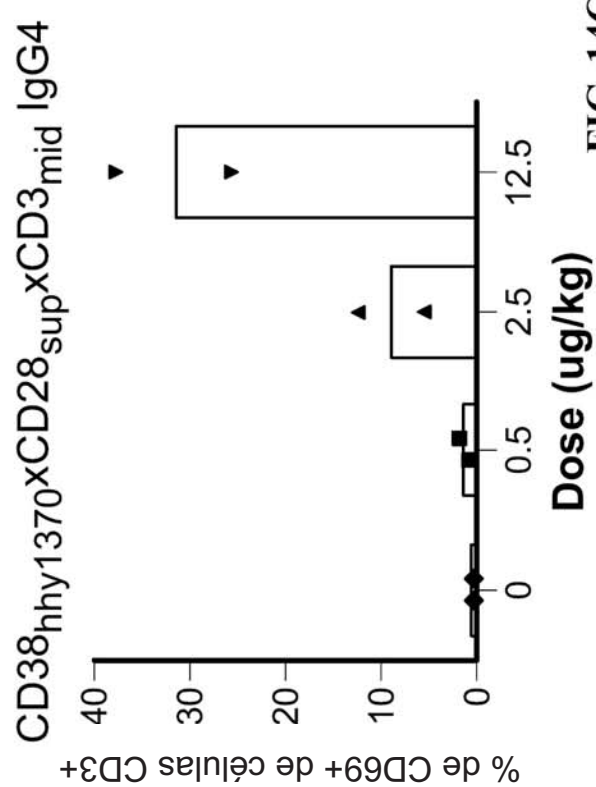
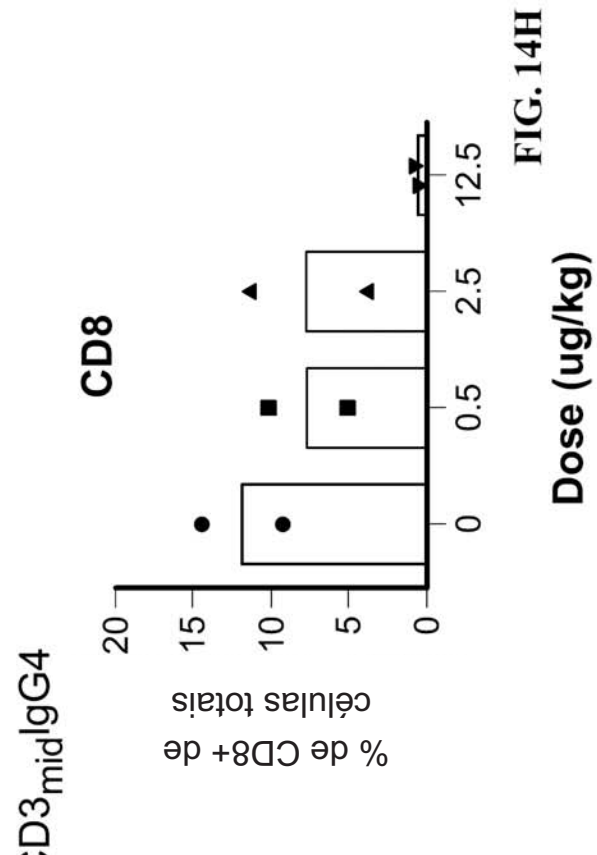
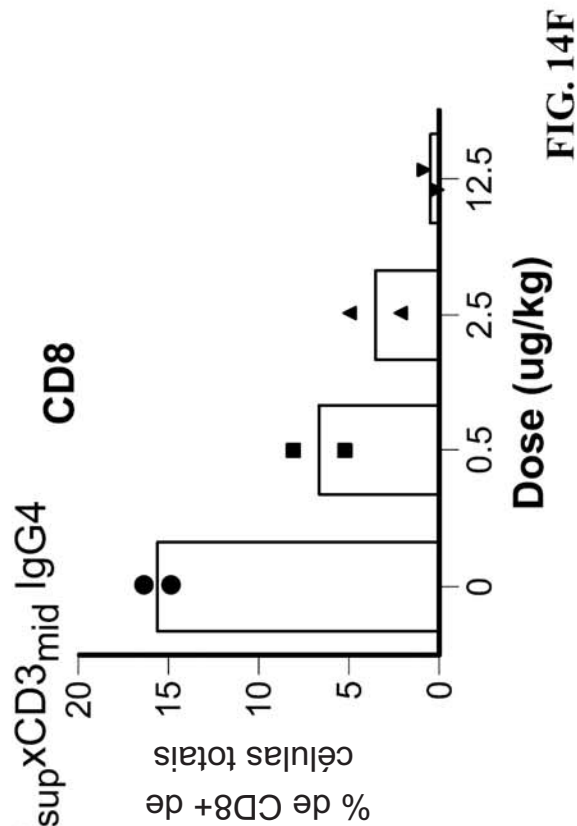
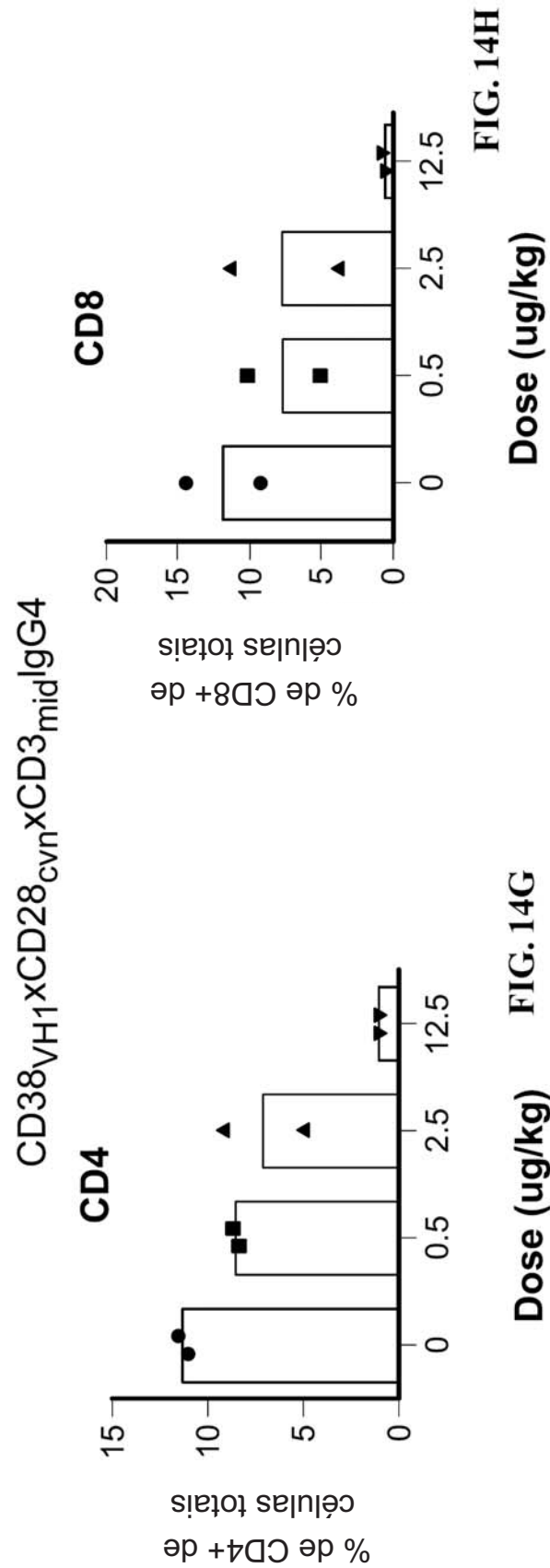
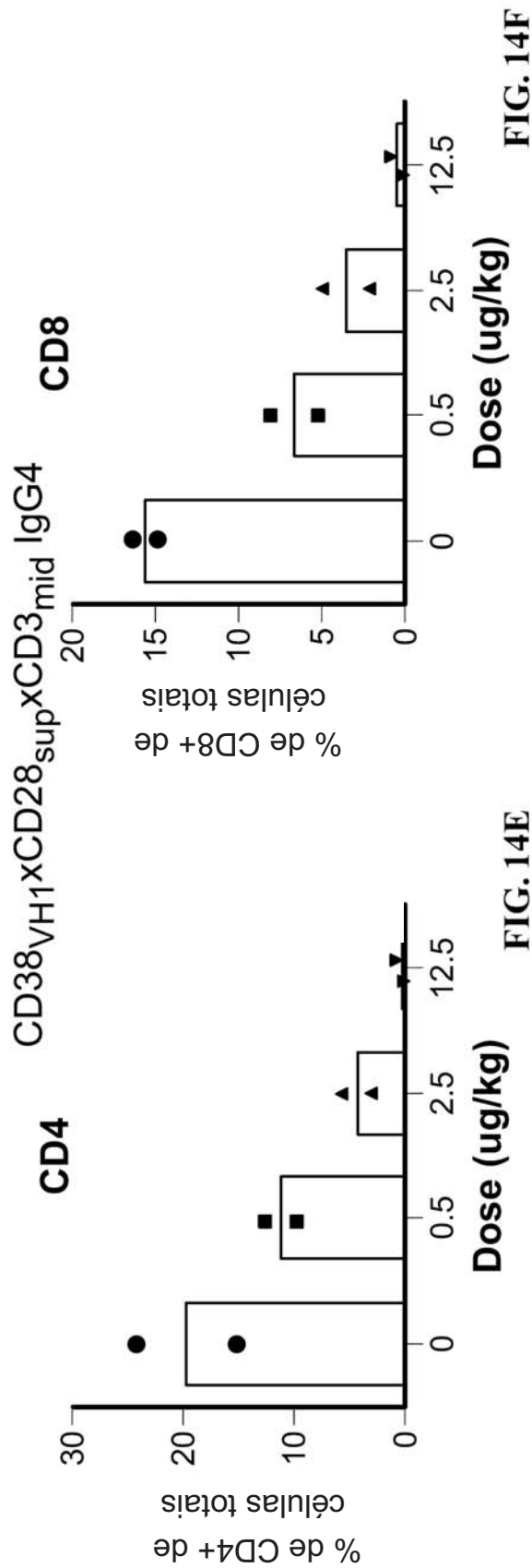


FIG. 14C



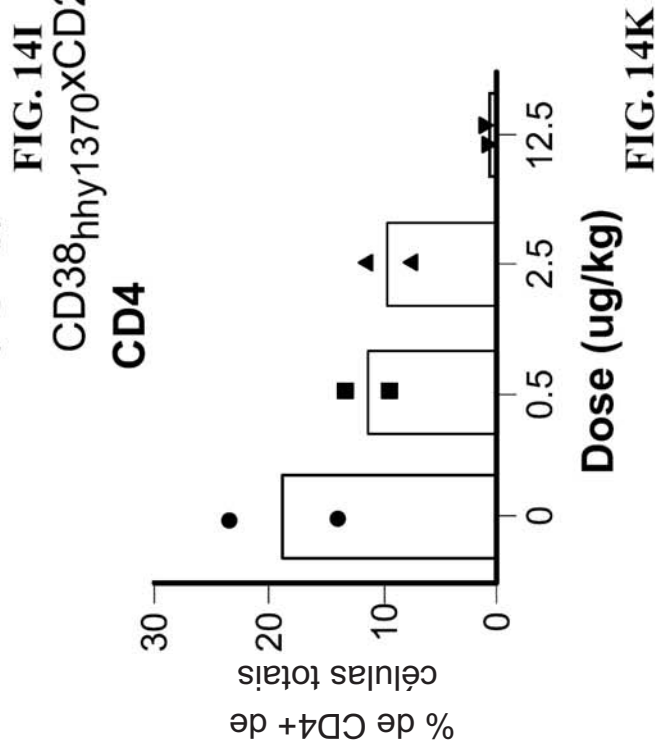
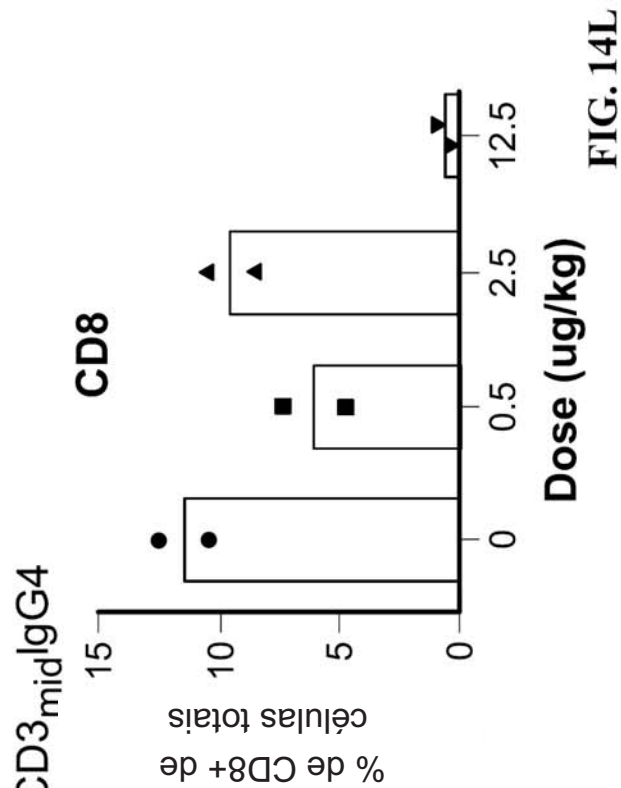
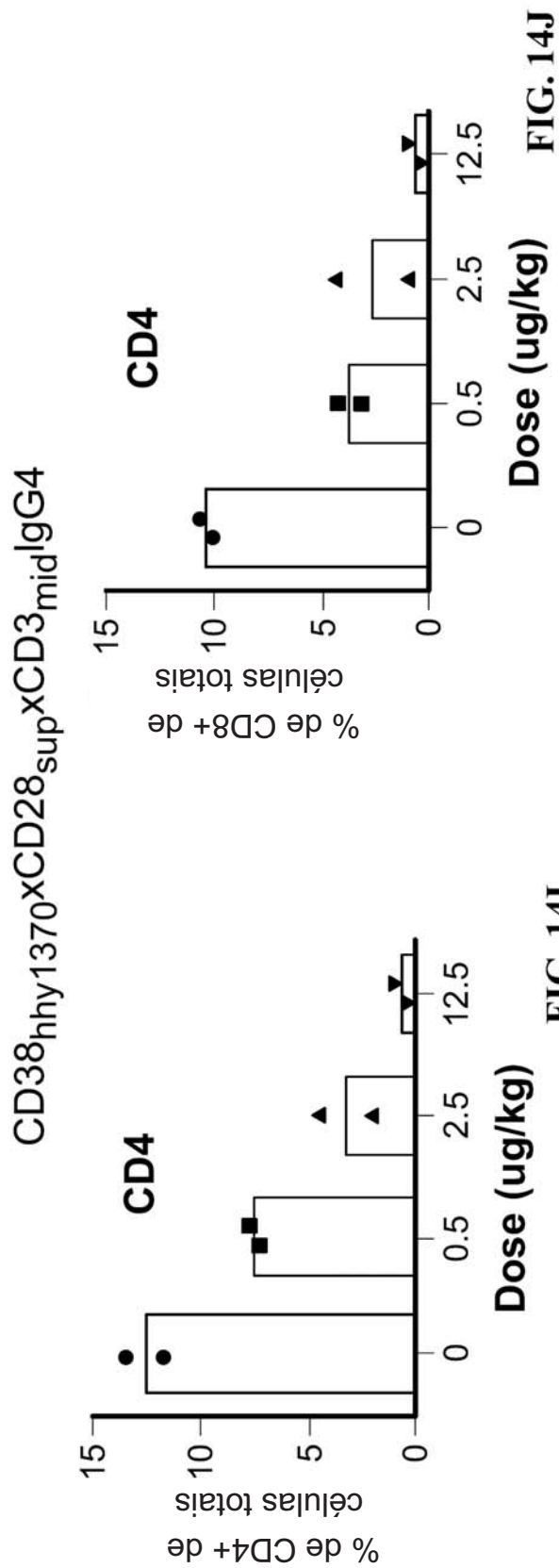


FIG. 14L

FIG. 14M

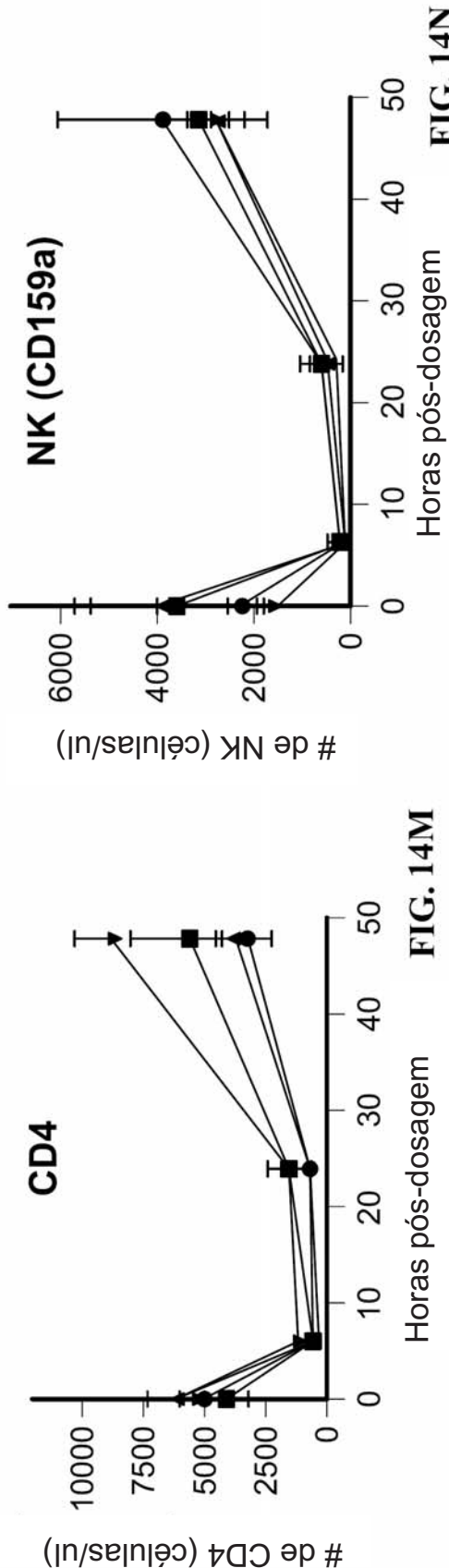
FIG. 14N

FIG. 14O

FIG. 14P

FIG. 14Q

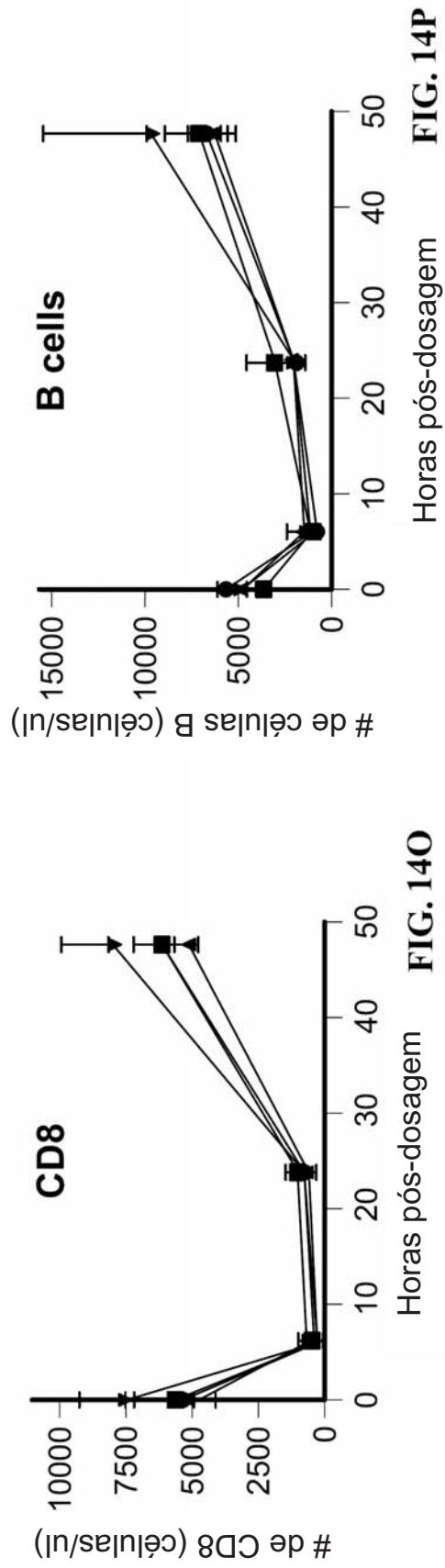
FIG. 14R



12.5 µg/kg

● CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}IgG4 ▲ CD38_{hhyl370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}IgG4

■ CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}IgG4 ▼ CD38_{hhyl370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}IgG4



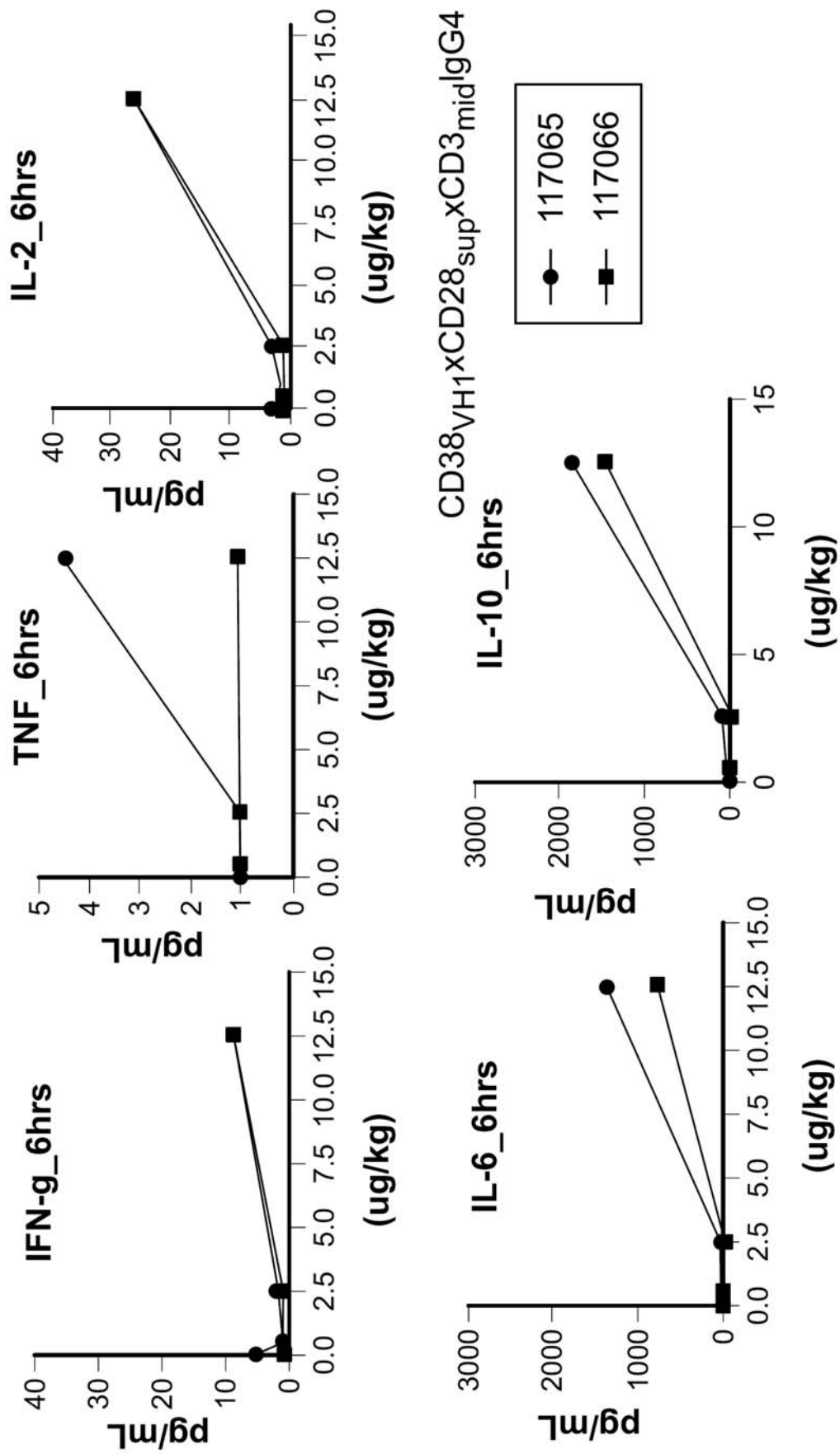


FIG. 14Q

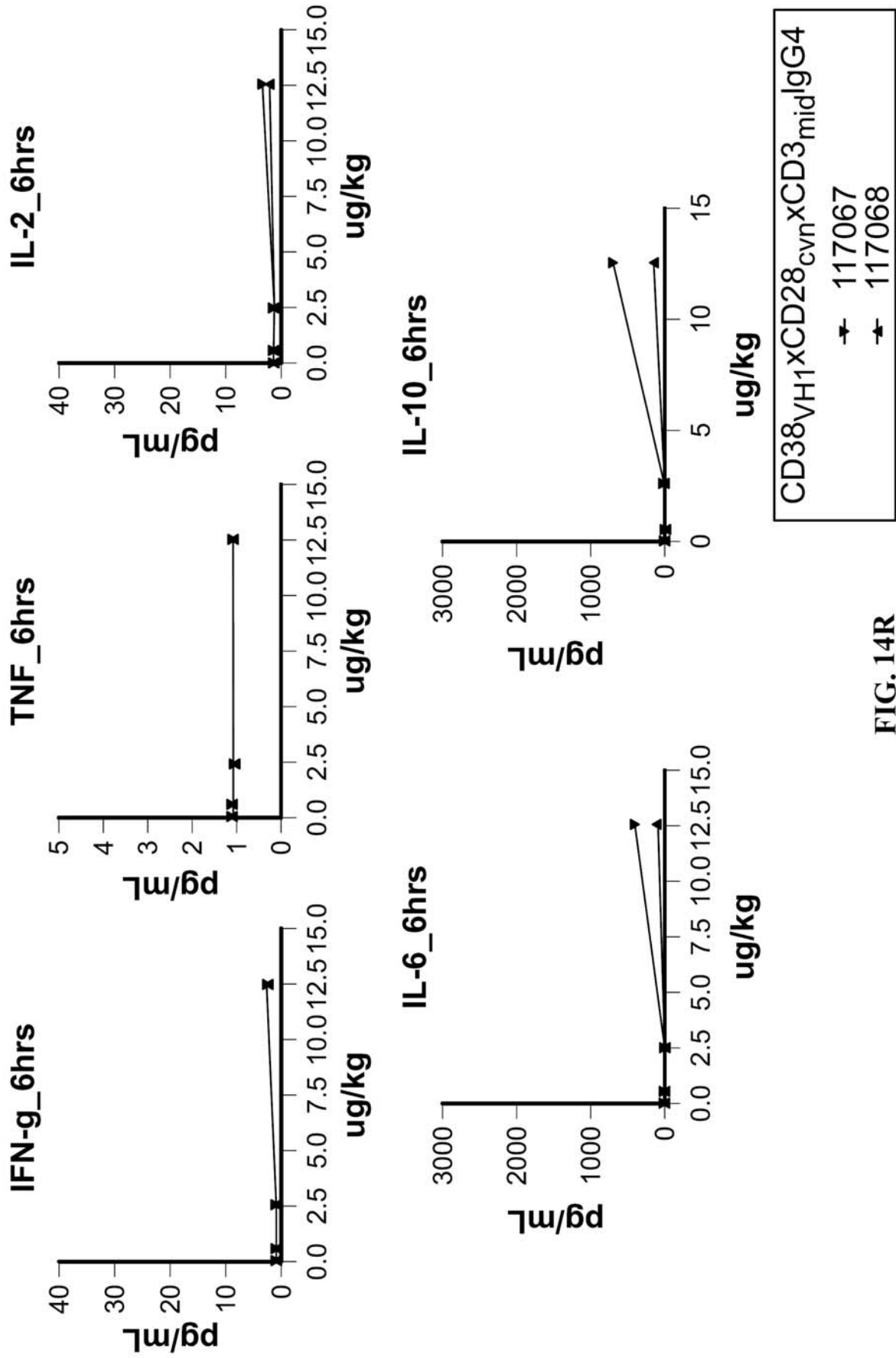


FIG. 14R

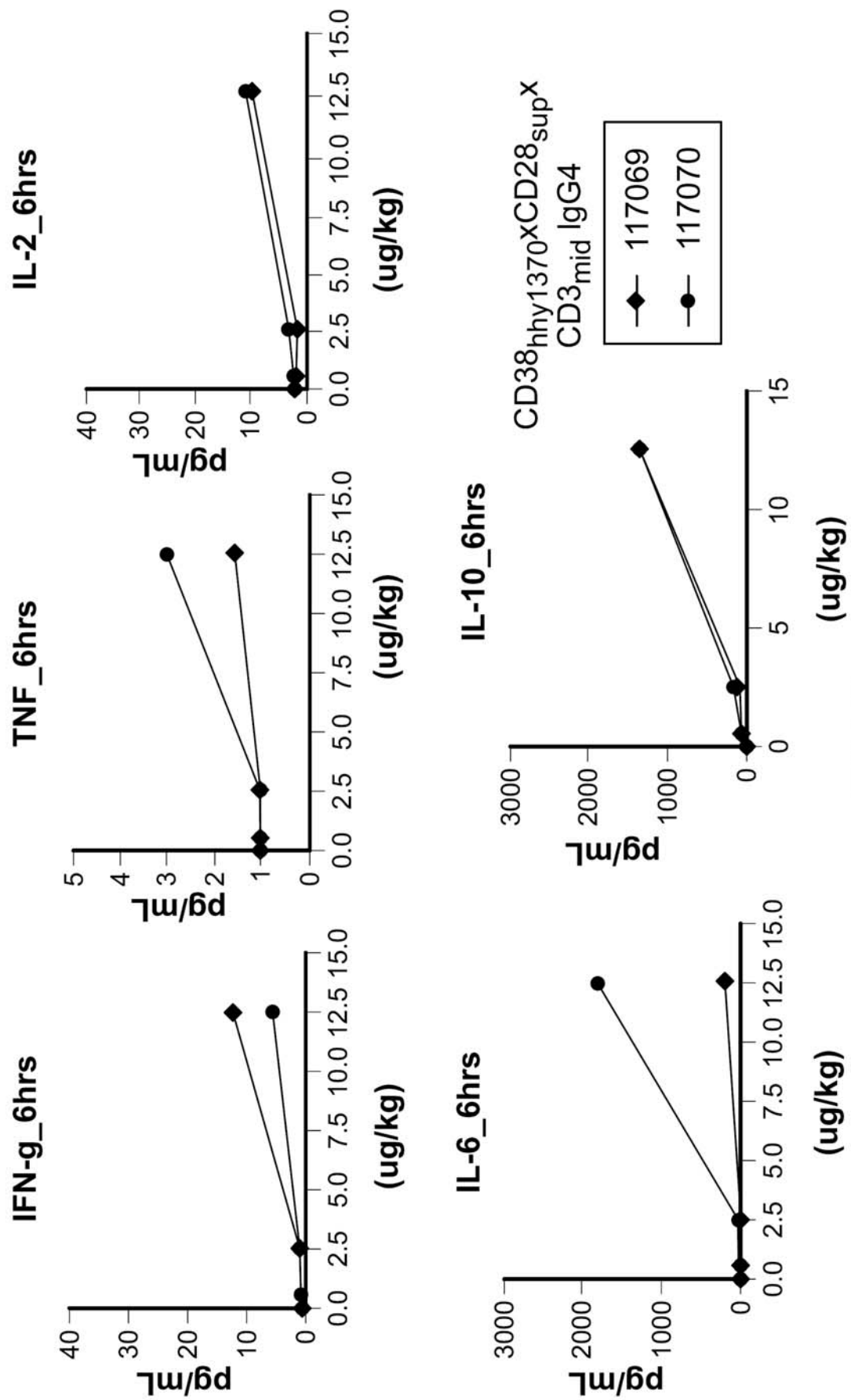


FIG. 14S

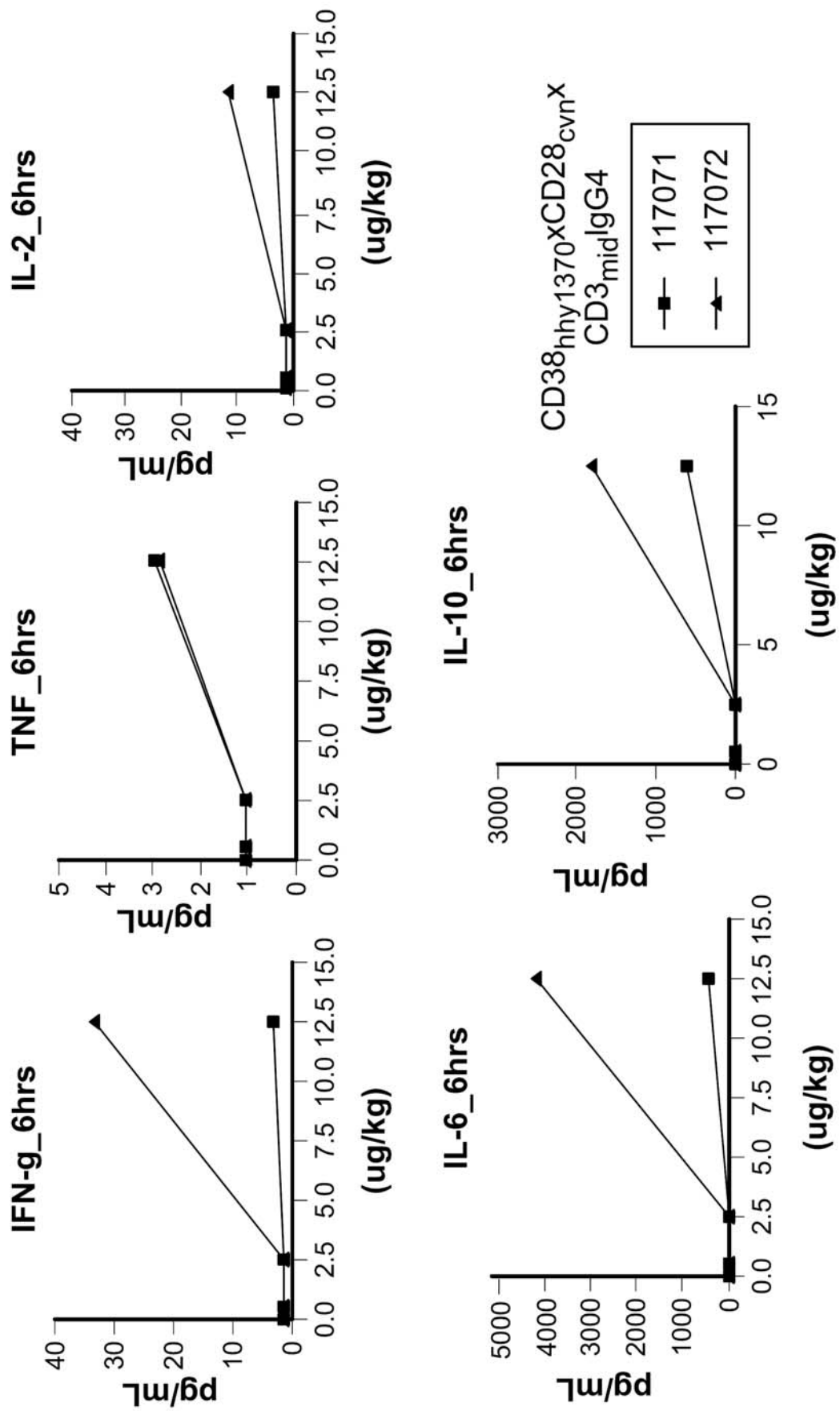


FIG. 14T

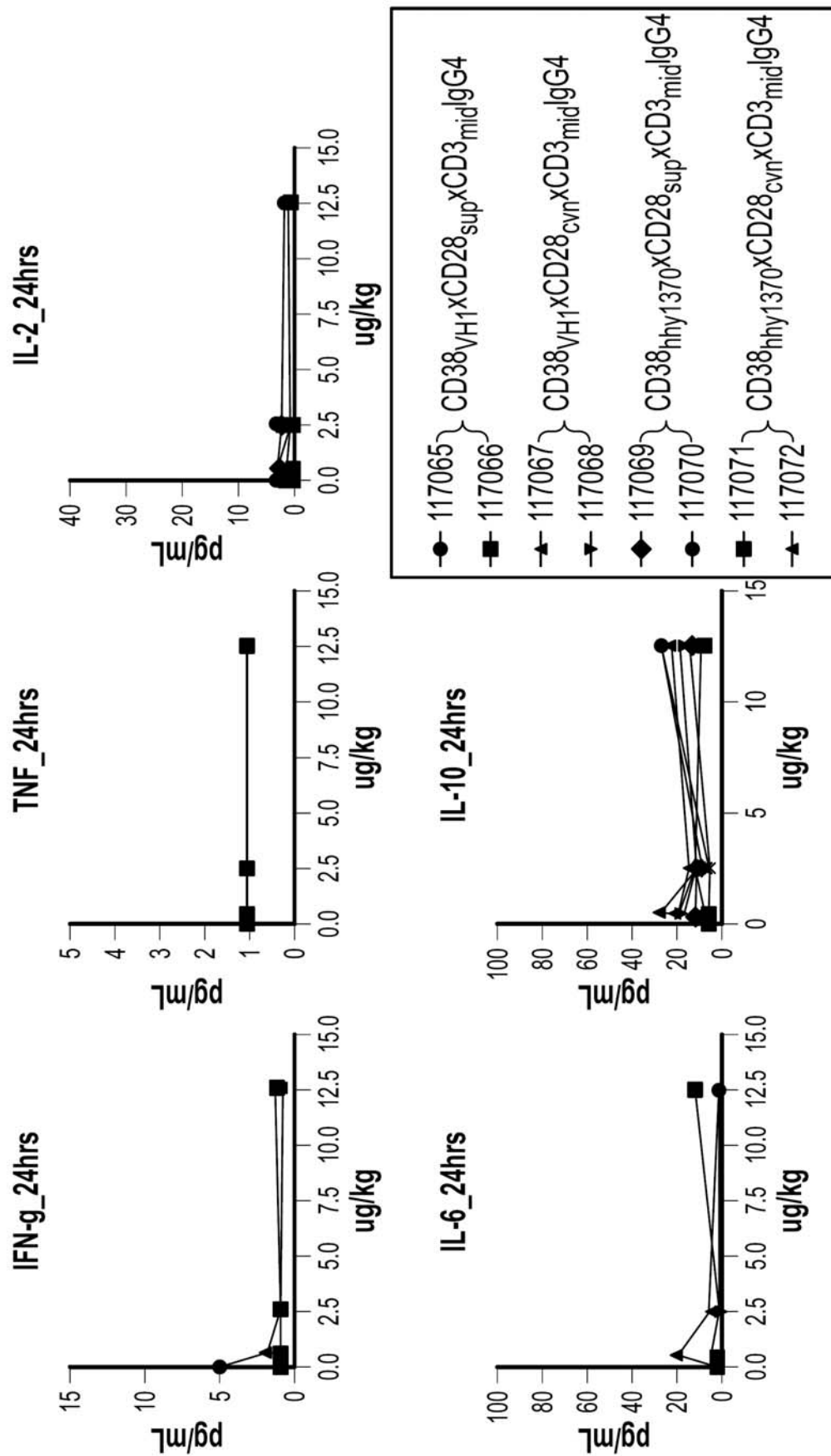


FIG. 14U

CD38_{VH1} / CD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4

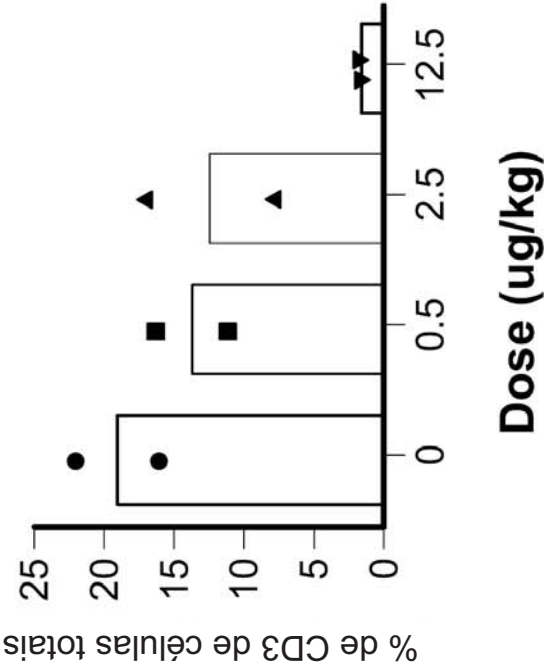


FIG. 14W

CD38_{VH1} / CD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4

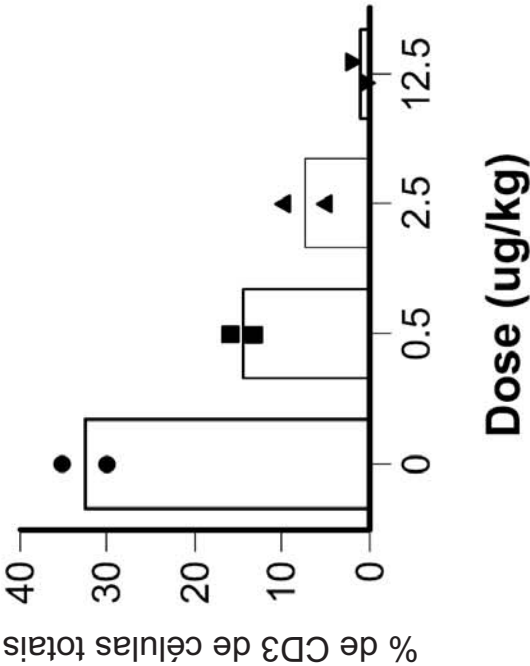


FIG. 14V

CD38_{hhy1370}/ CD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4

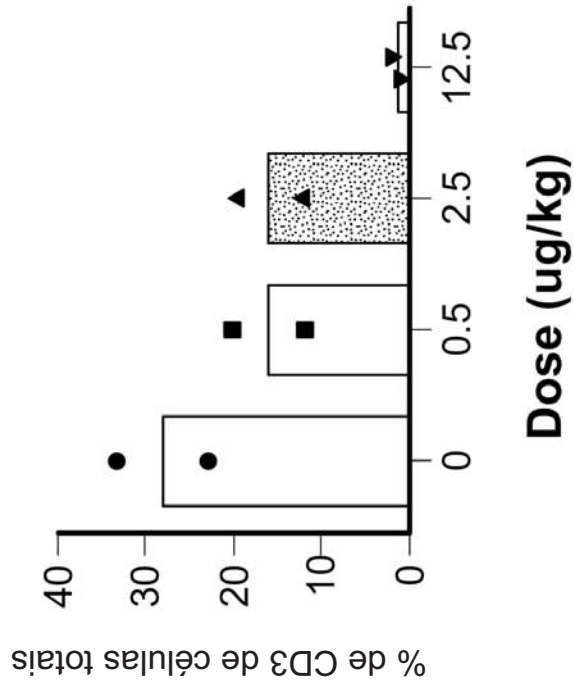


FIG. 14Y

CD38_{hhy1370}/ CD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4

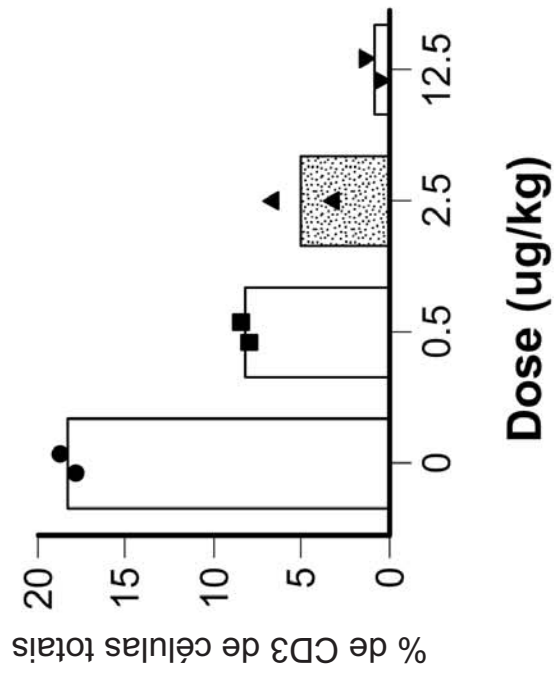


FIG. 14X

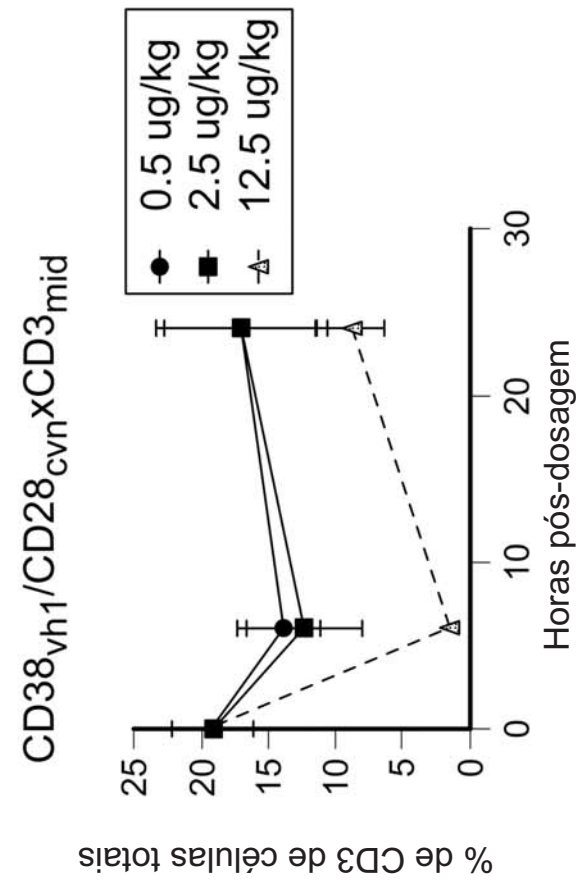


FIG. 14AA

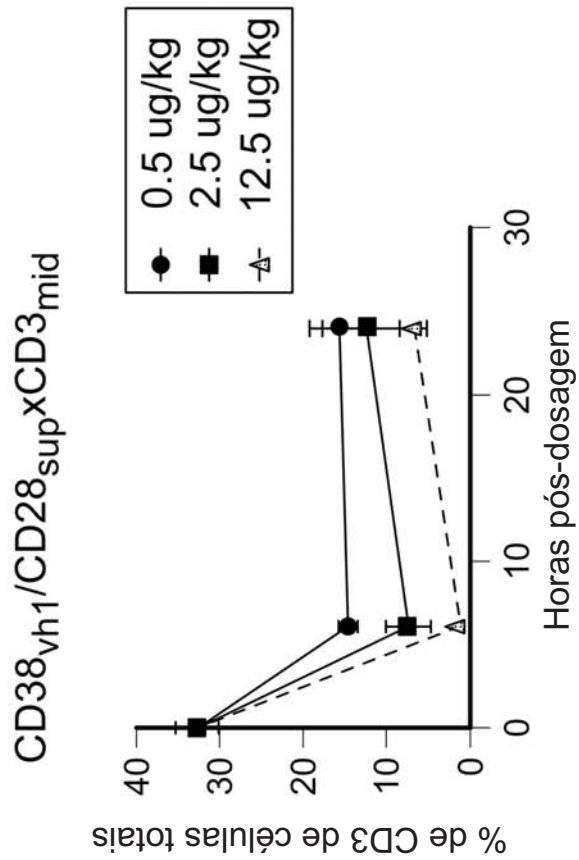


FIG. 14Z

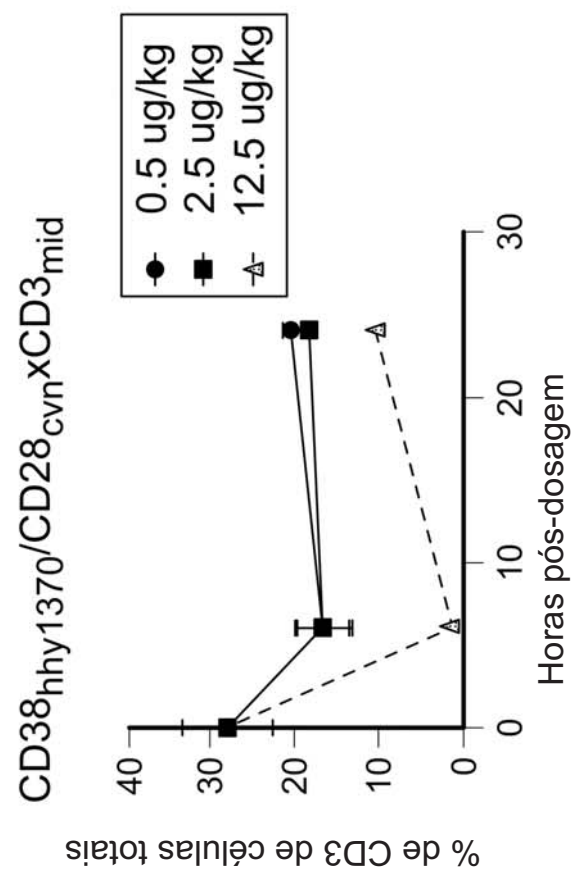


FIG. 14AC

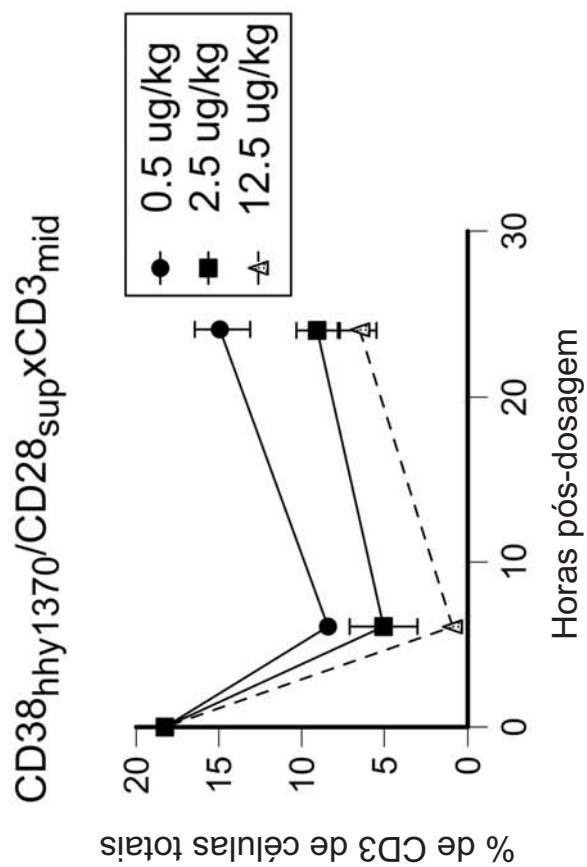
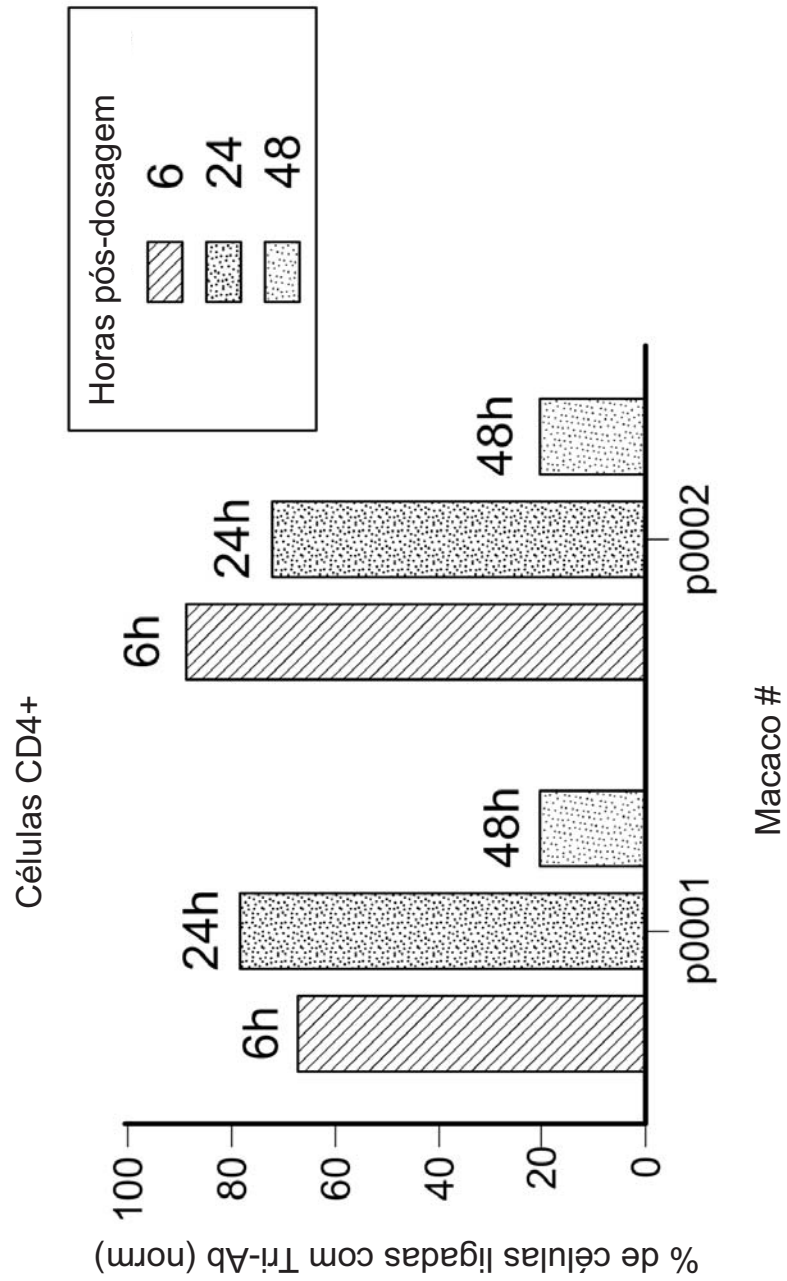


FIG. 14AB

**FIG. 14AD**

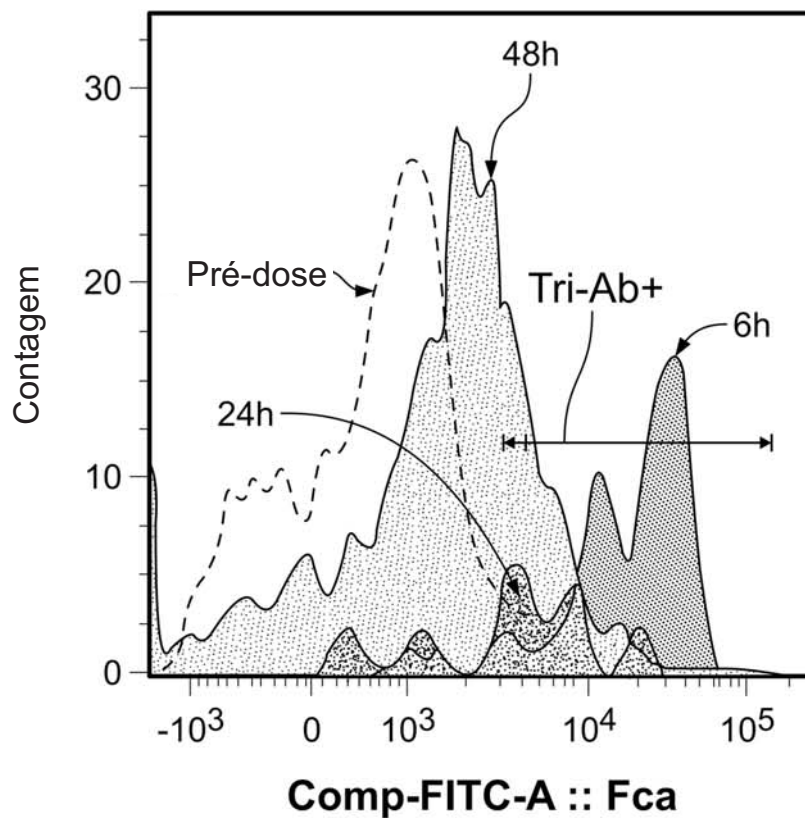
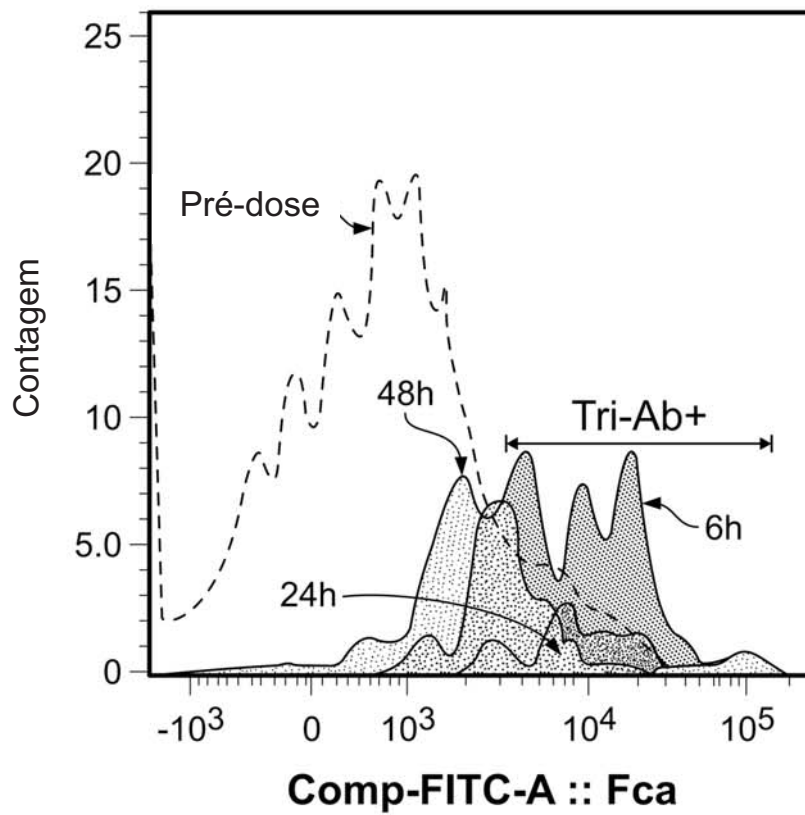
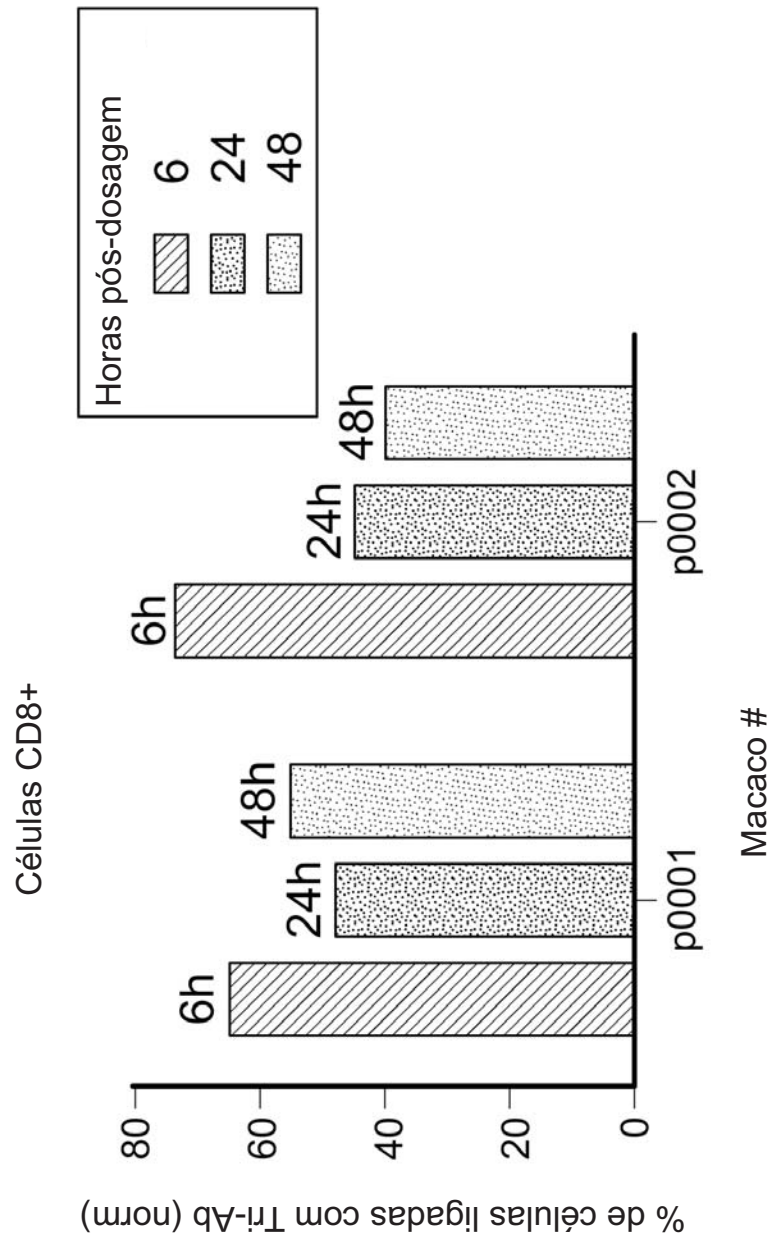


FIG. 14AE

**FIG. 14AF**

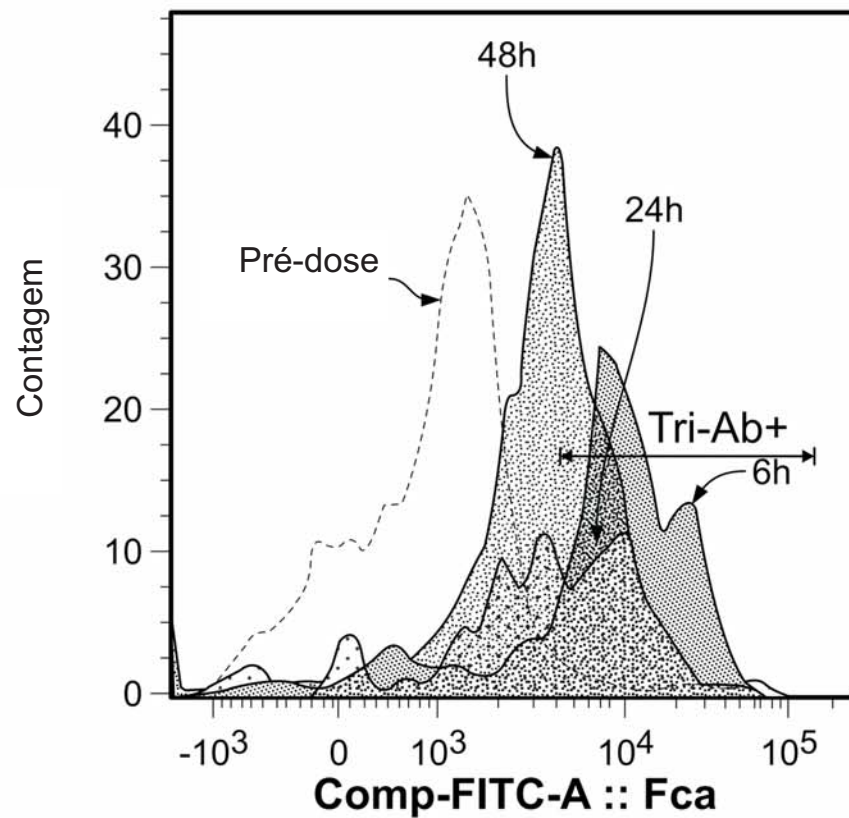
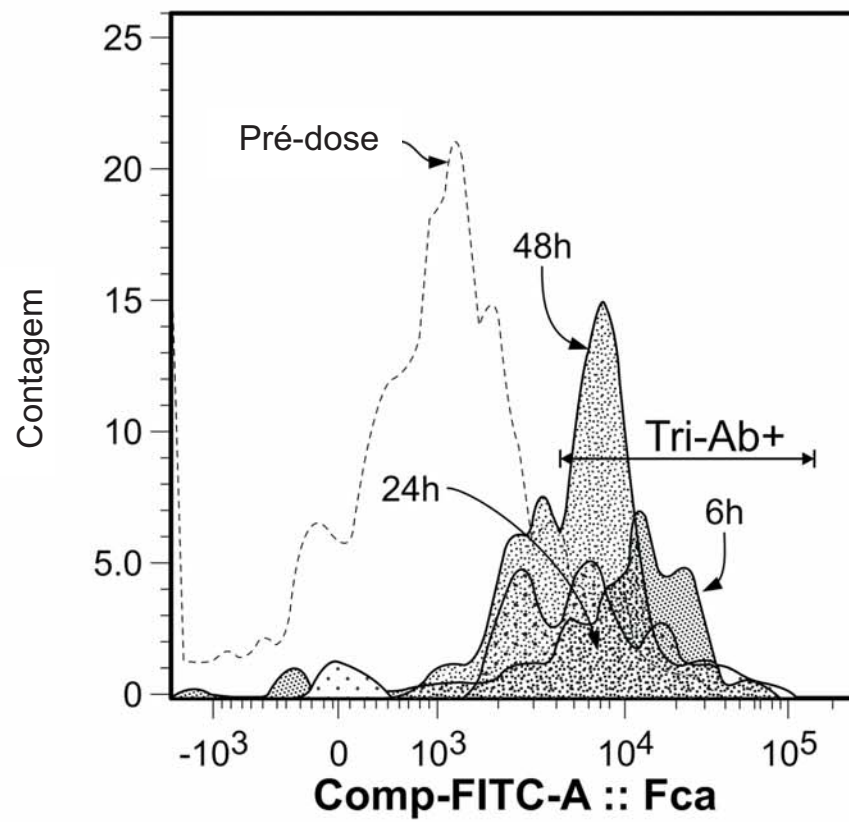


FIG. 14AG

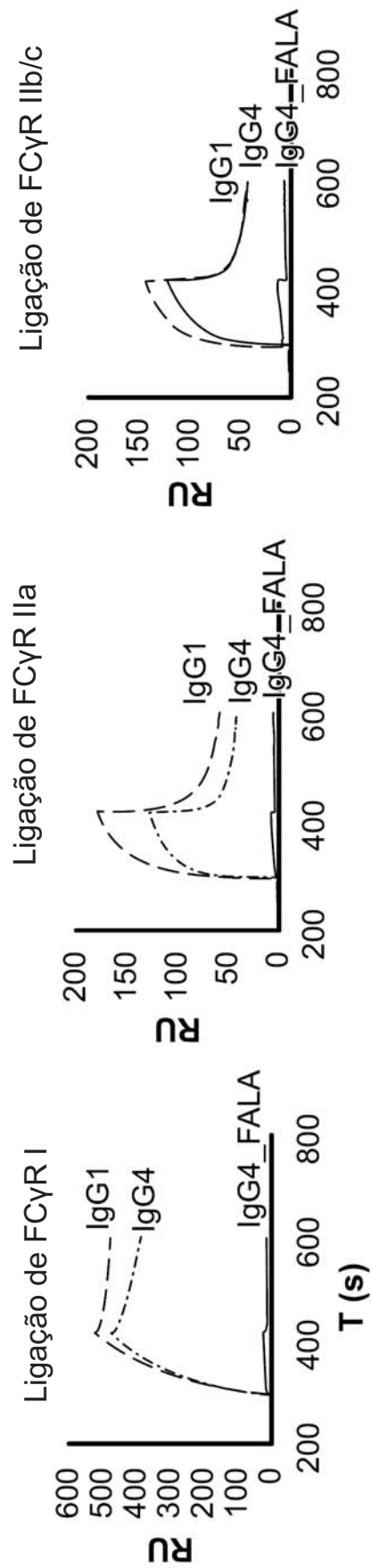


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

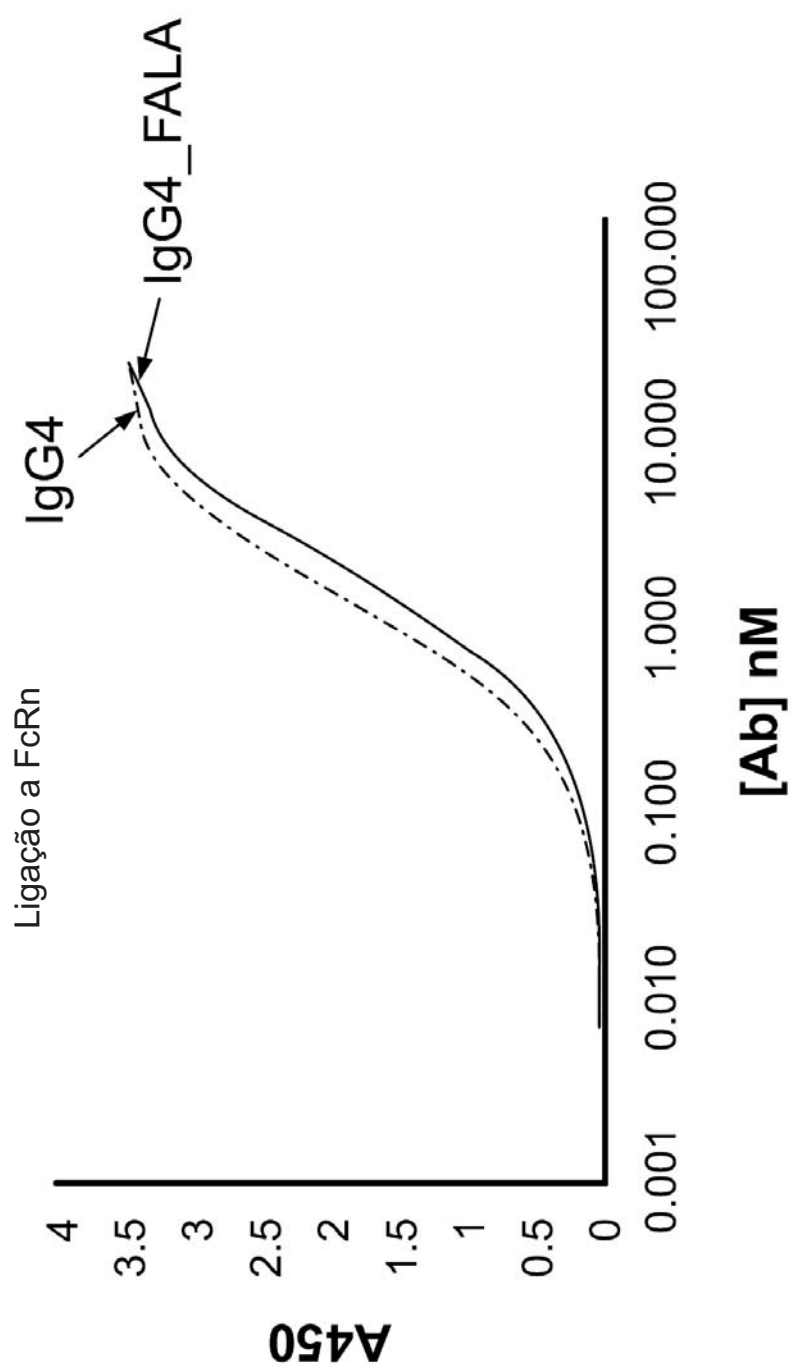


FIG. 16

Anticorpo	Tmax (hr)	Cmax (ng/ml)	Tlast (hr)	Clast (ng/ml)	T 1/2 (hr)	AUCall (hr* ng/ml)
anti- hCD38 _{VH1} /CD28 _{sup} X CD3 _{mid} IgG4	0.083	460	72	16.6	24	4850
anti- hCD38 _{VH1} /CD28 _{sup} X CD3 _{mid} IgG4 FALA	0.083	495	336	117.1	234	61200
anti- hCD38 _{VH1} /CD28 _{sup} X CD3 _{mid} IgG1 LALA P329A	0.083	621	336	93.2	277	49400
anti- hCD38 _{hhy1370} /CD28 _{su} pXCD3 _{mid} IgG4 FALA	0.083	645	336	112.9	255	64500

FIG. 17

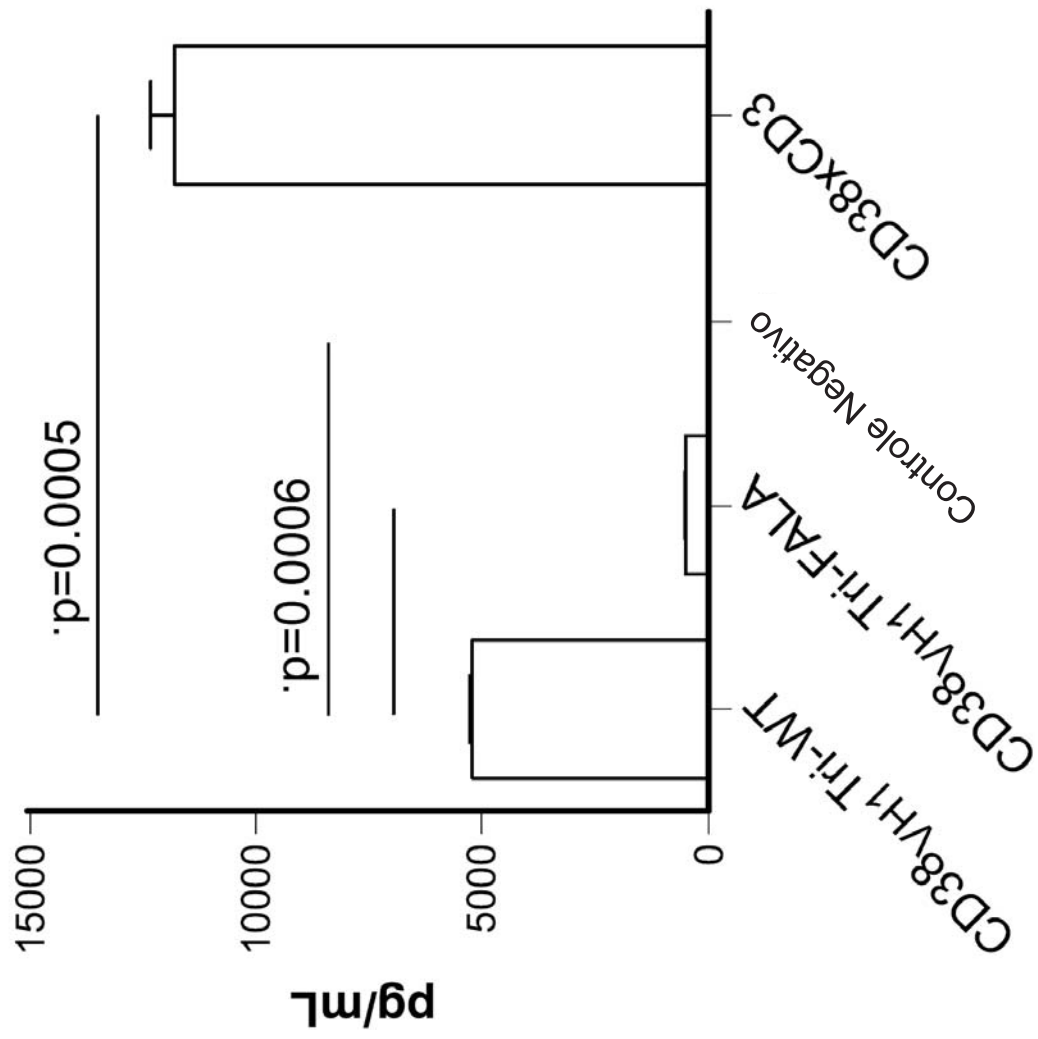


FIG. 18A

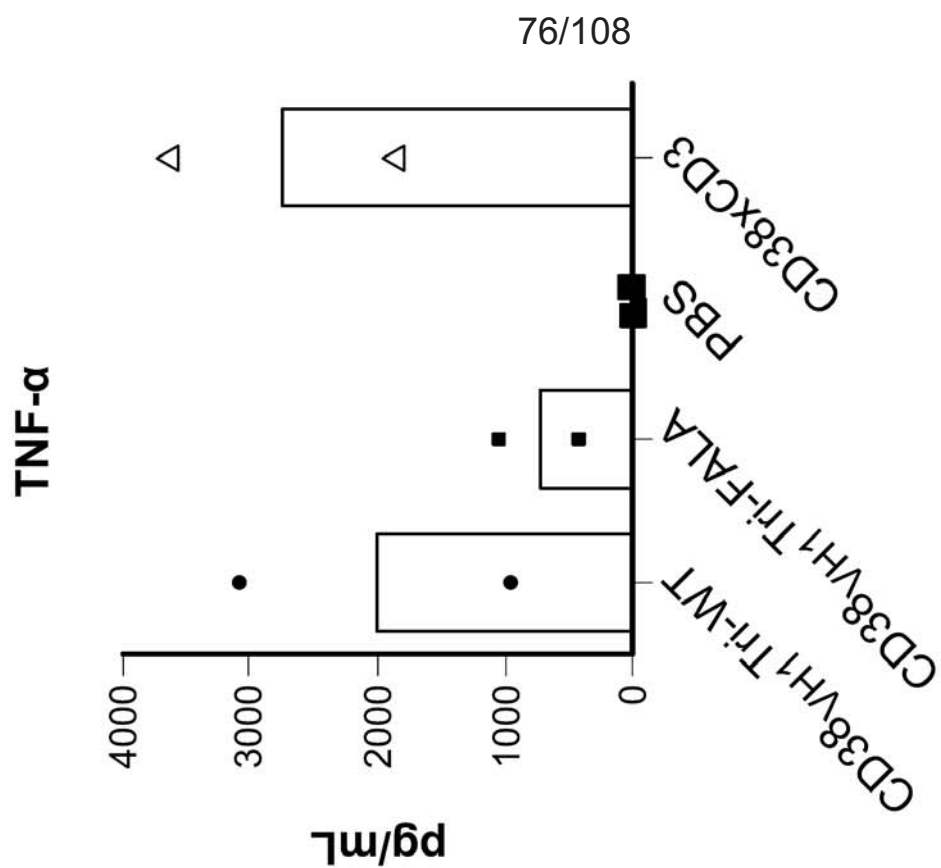


FIG. 18C

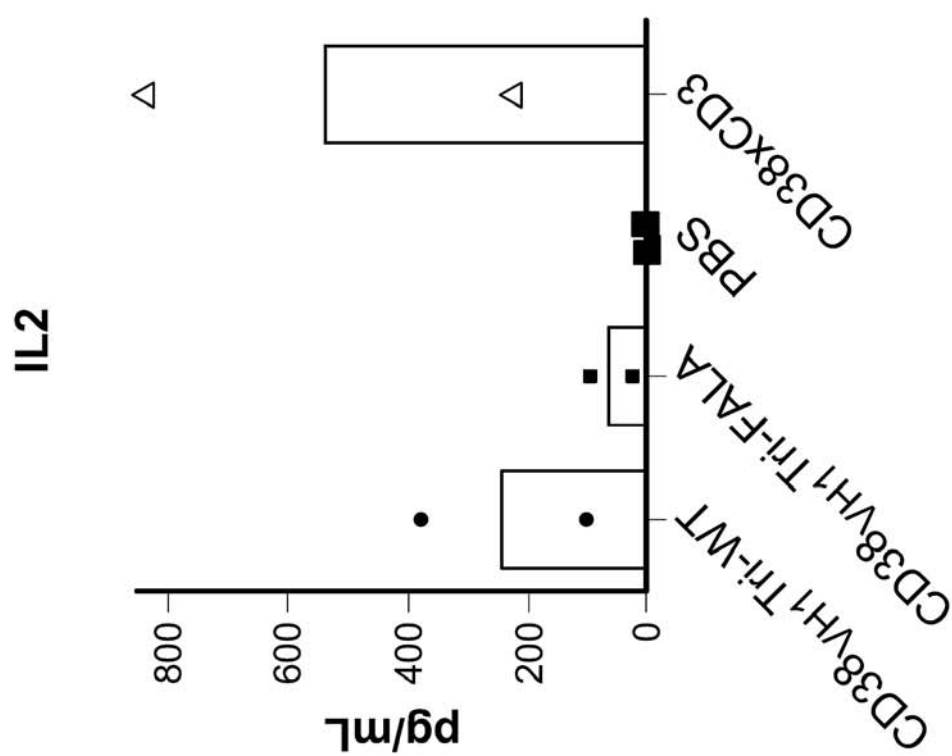


FIG. 18B

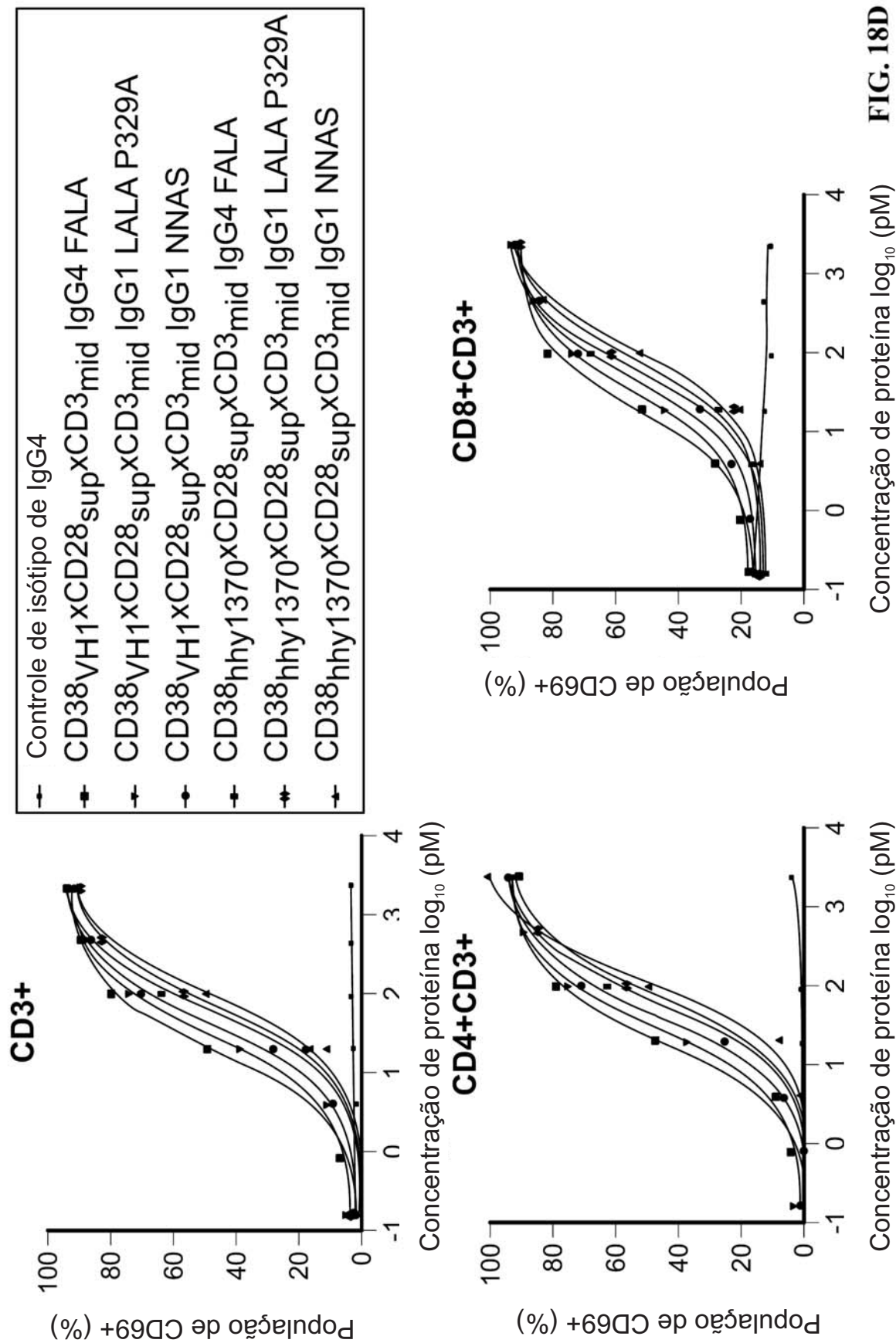


FIG. 18D

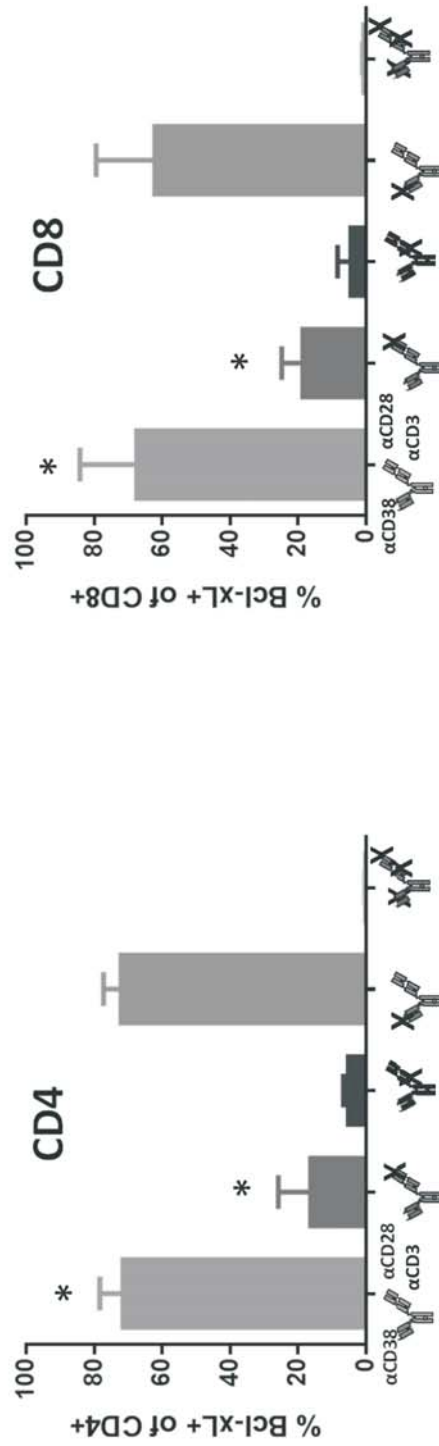
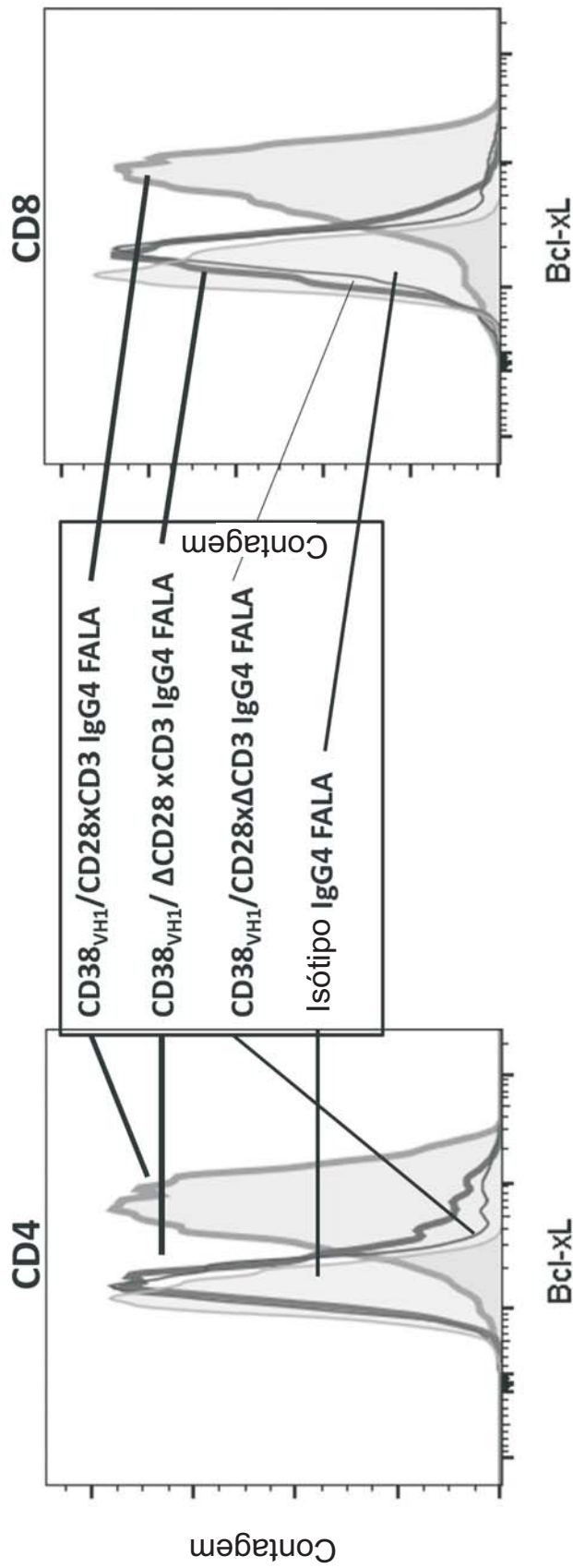


FIG. 19A

FIG. 19B

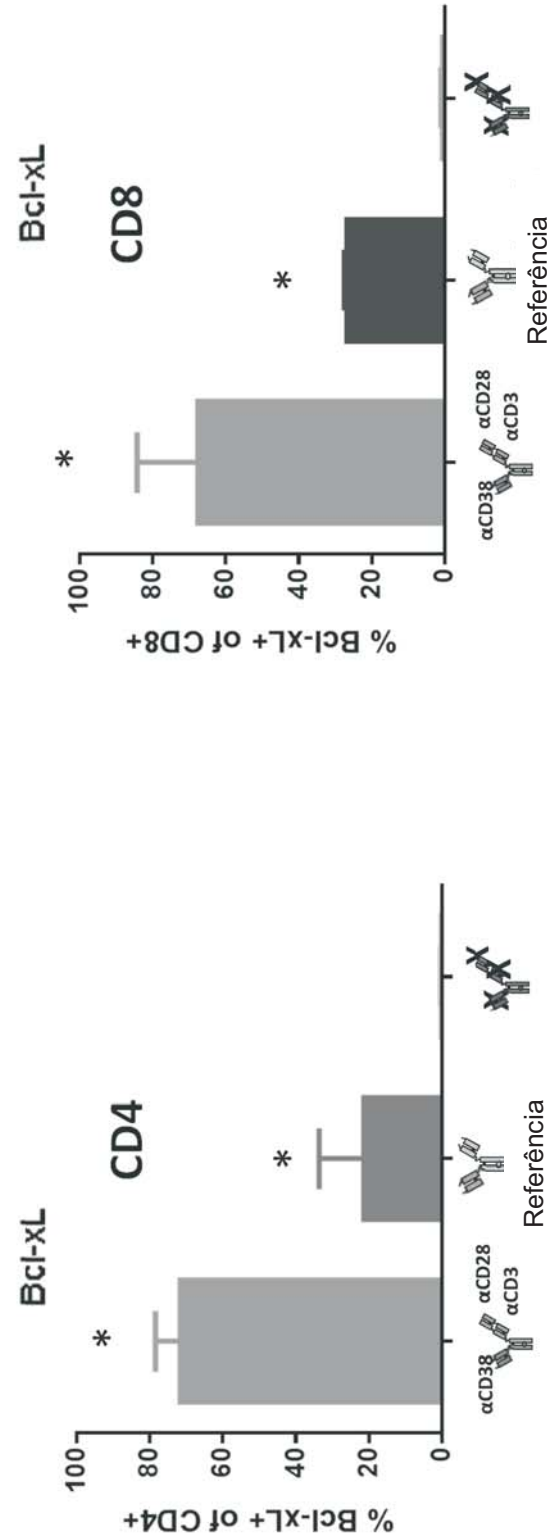
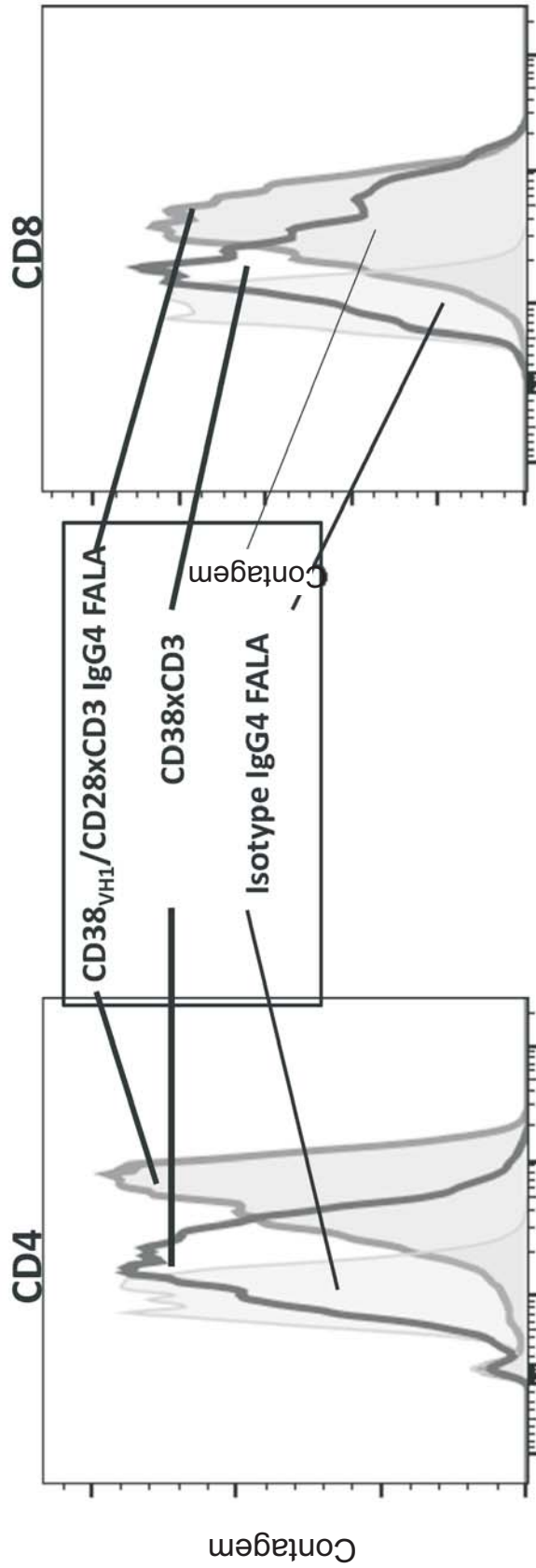


FIG. 19C

FIG. 19D

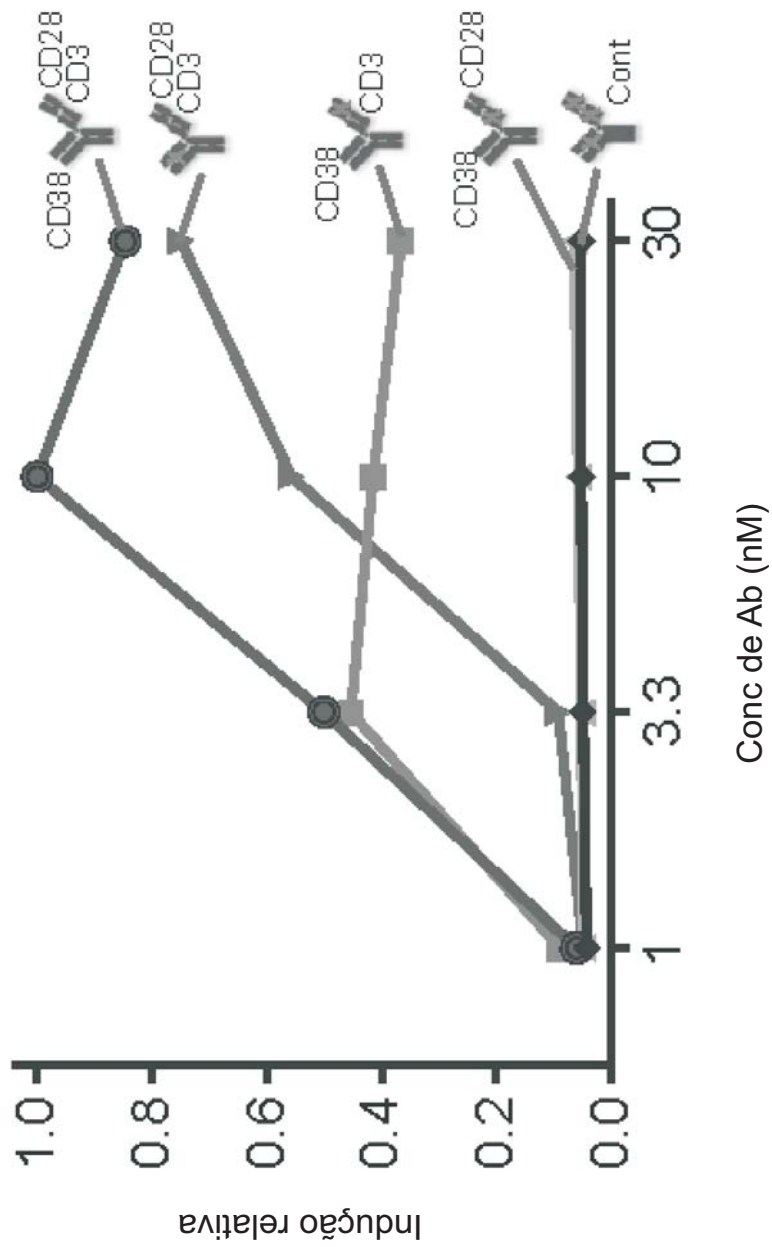


FIG. 19E

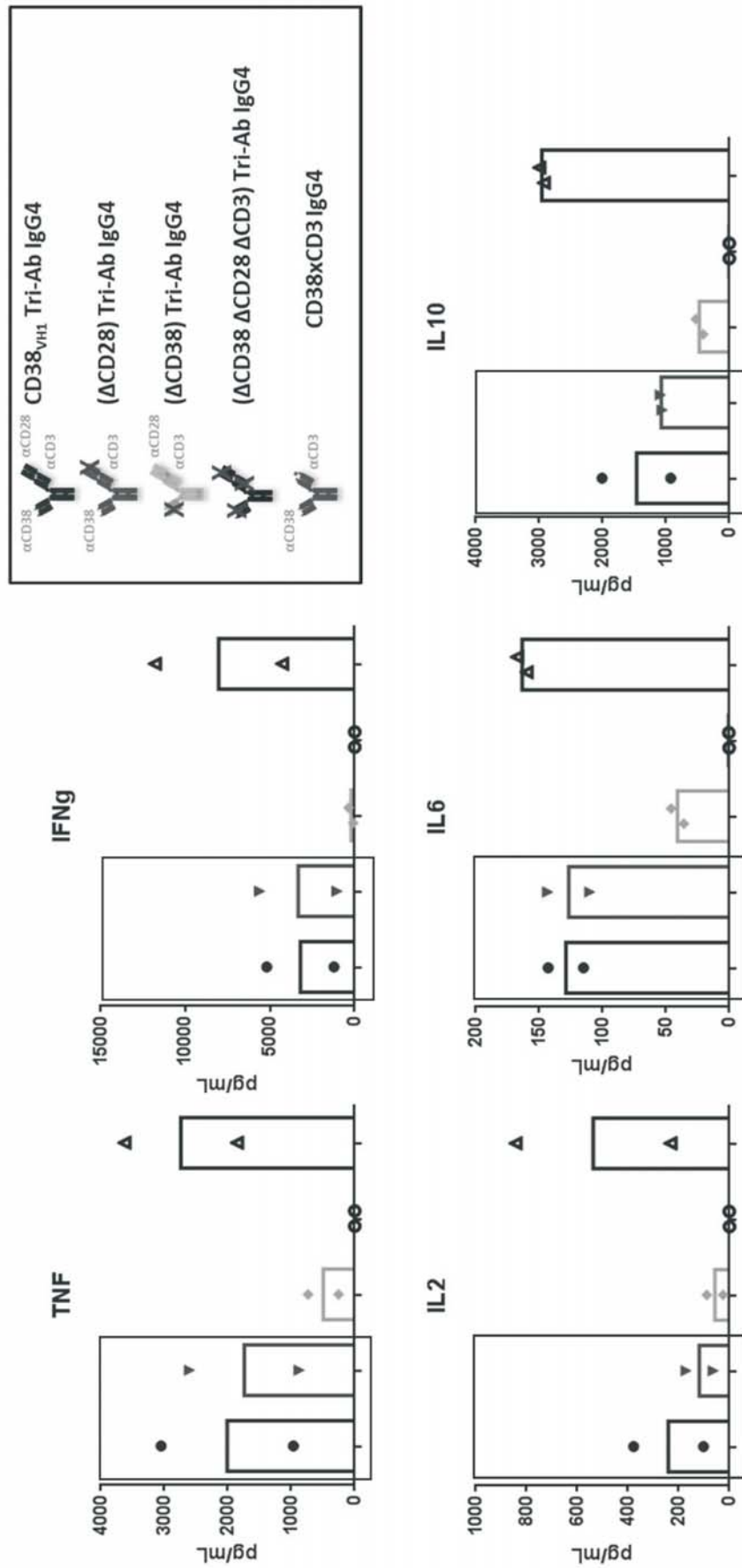


FIG. 19F

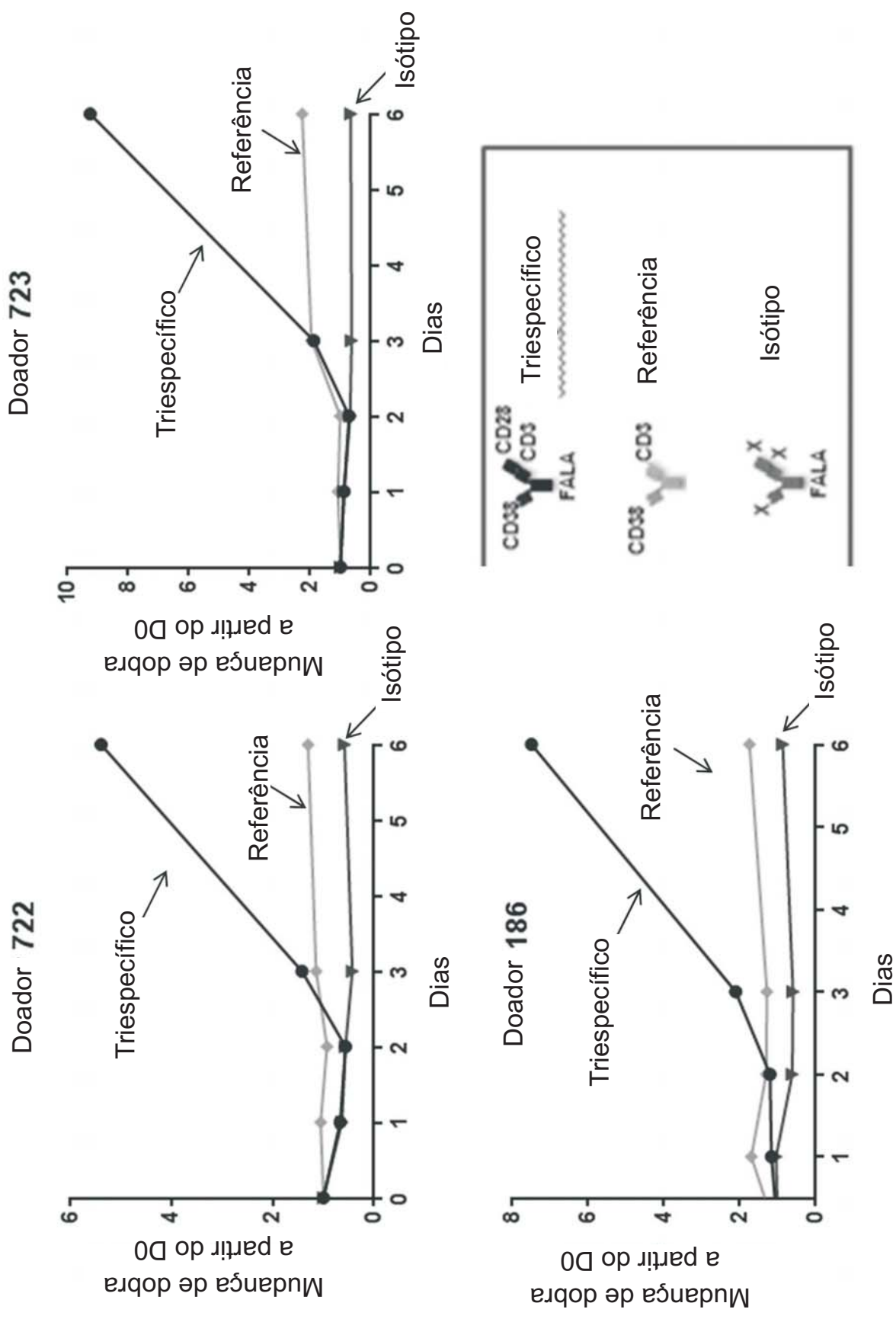


FIG. 19G

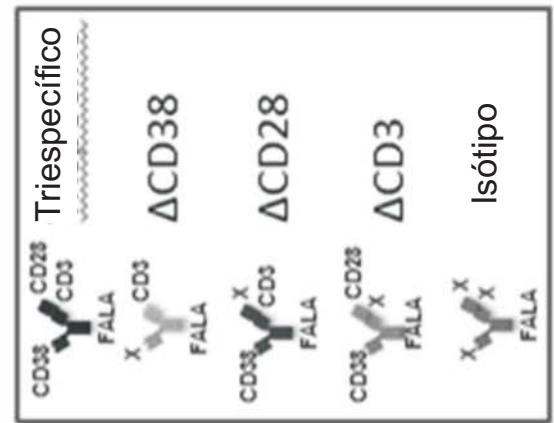
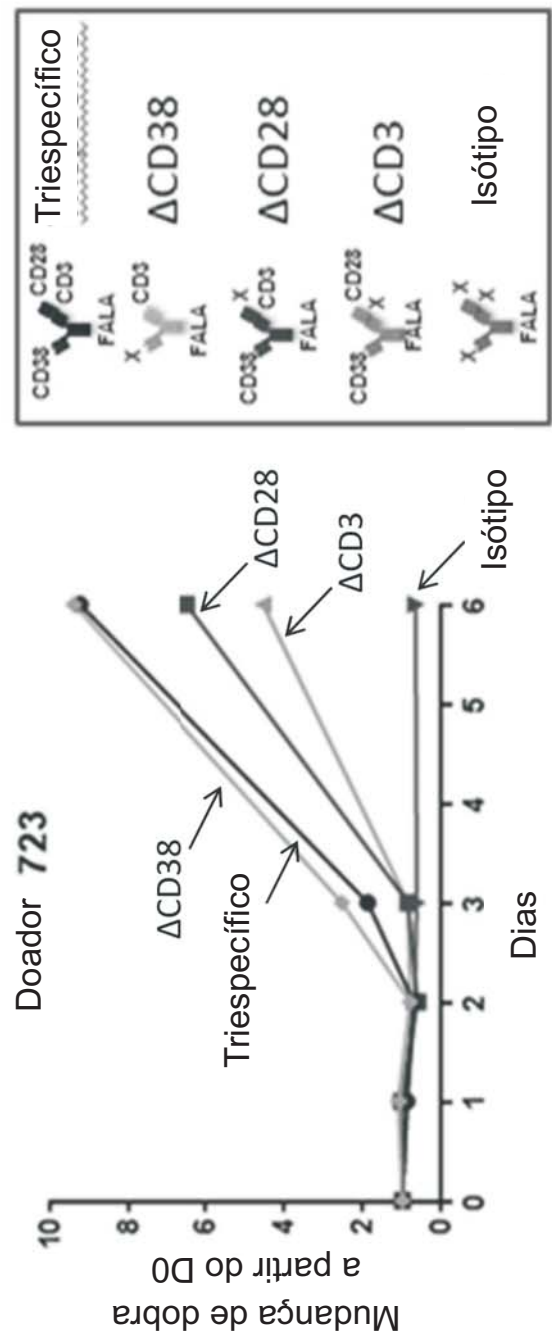
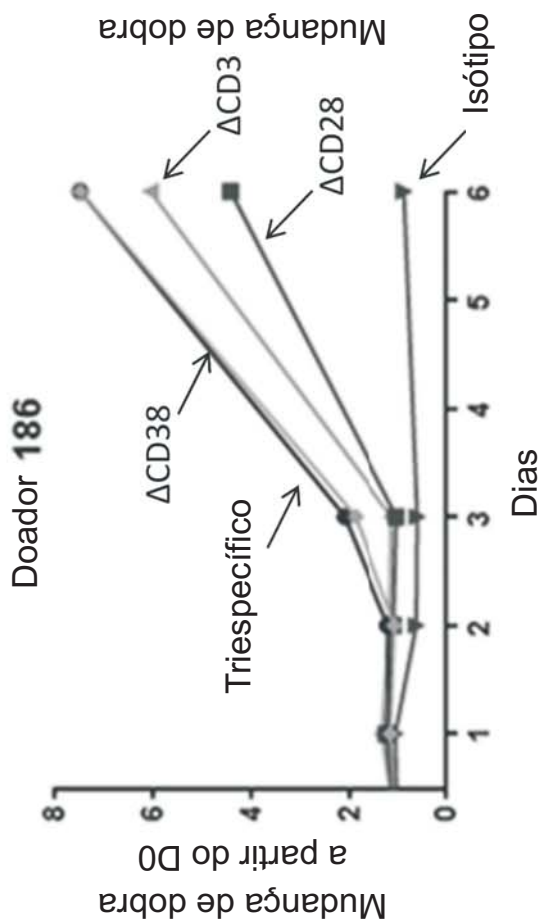
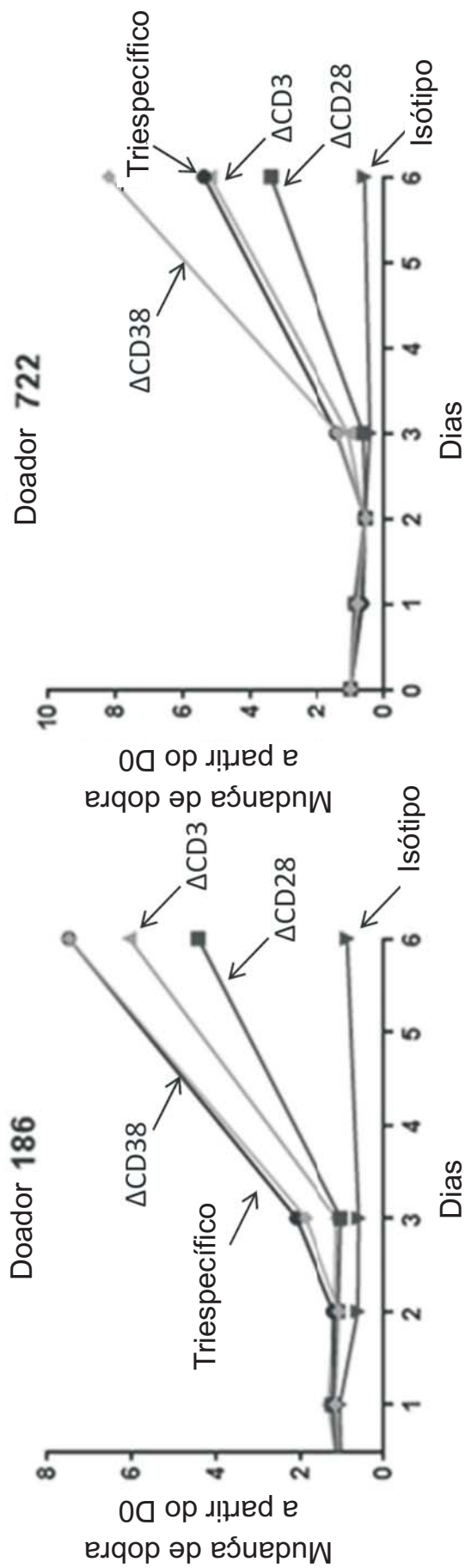
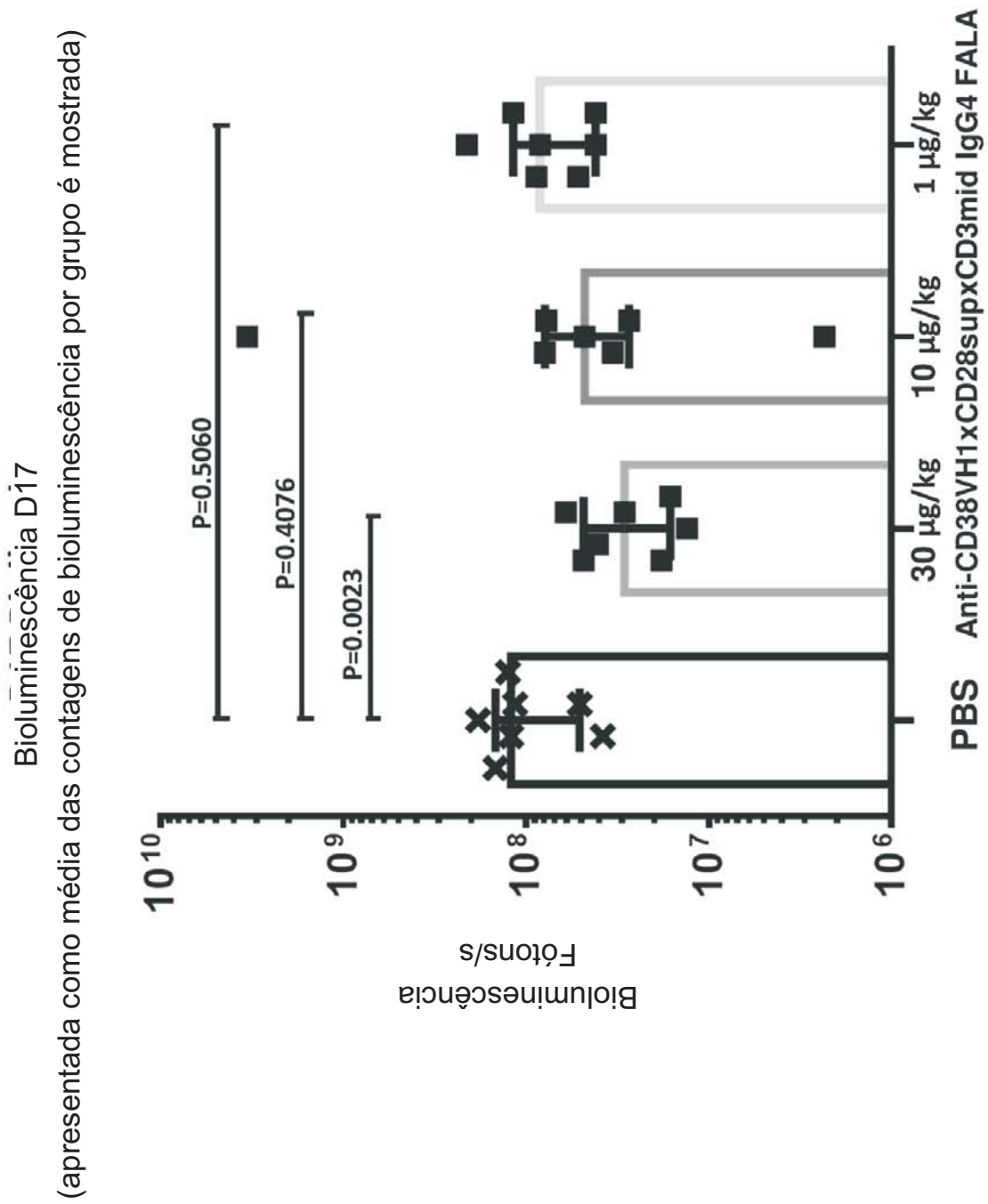
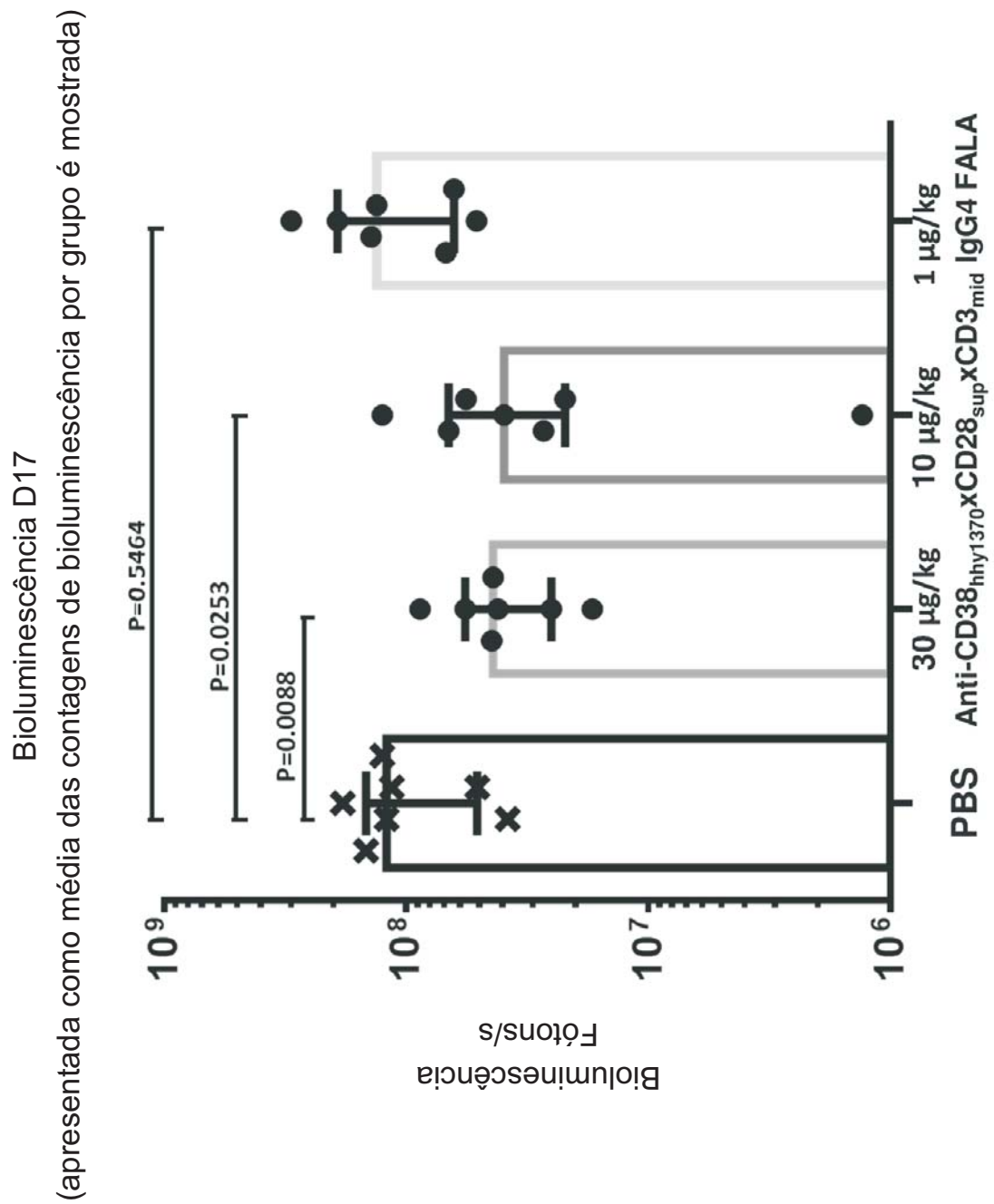
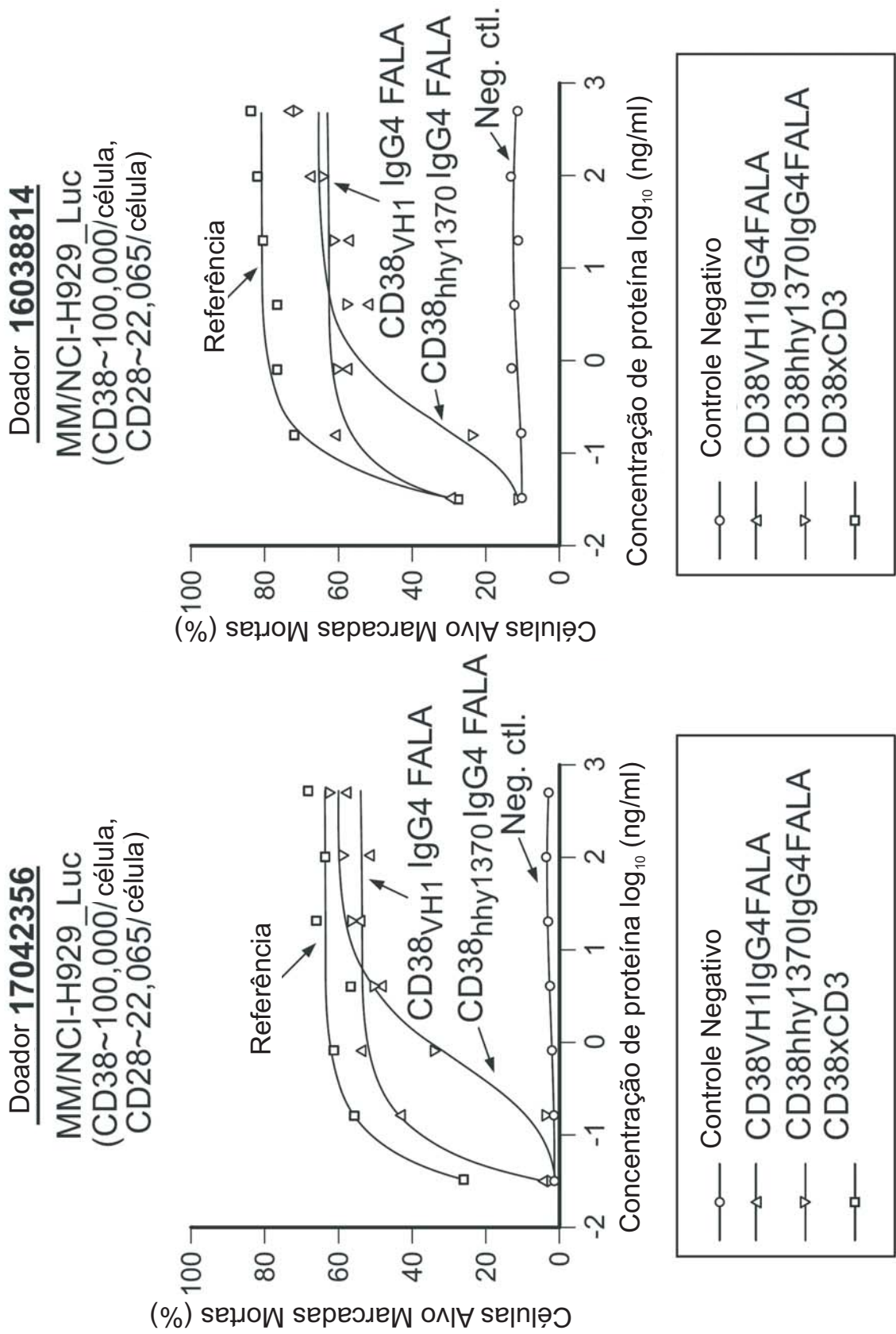


FIG. 20

**FIG. 21**





Doador 17042356
MM/NCI-H929_Luc
(CD38~100,000/célula,
CD28~22,065/célula)

Doador 16038814
MM/NCI-H929_Luc
(CD38~100,000/célula,
CD28~22,065/célula)

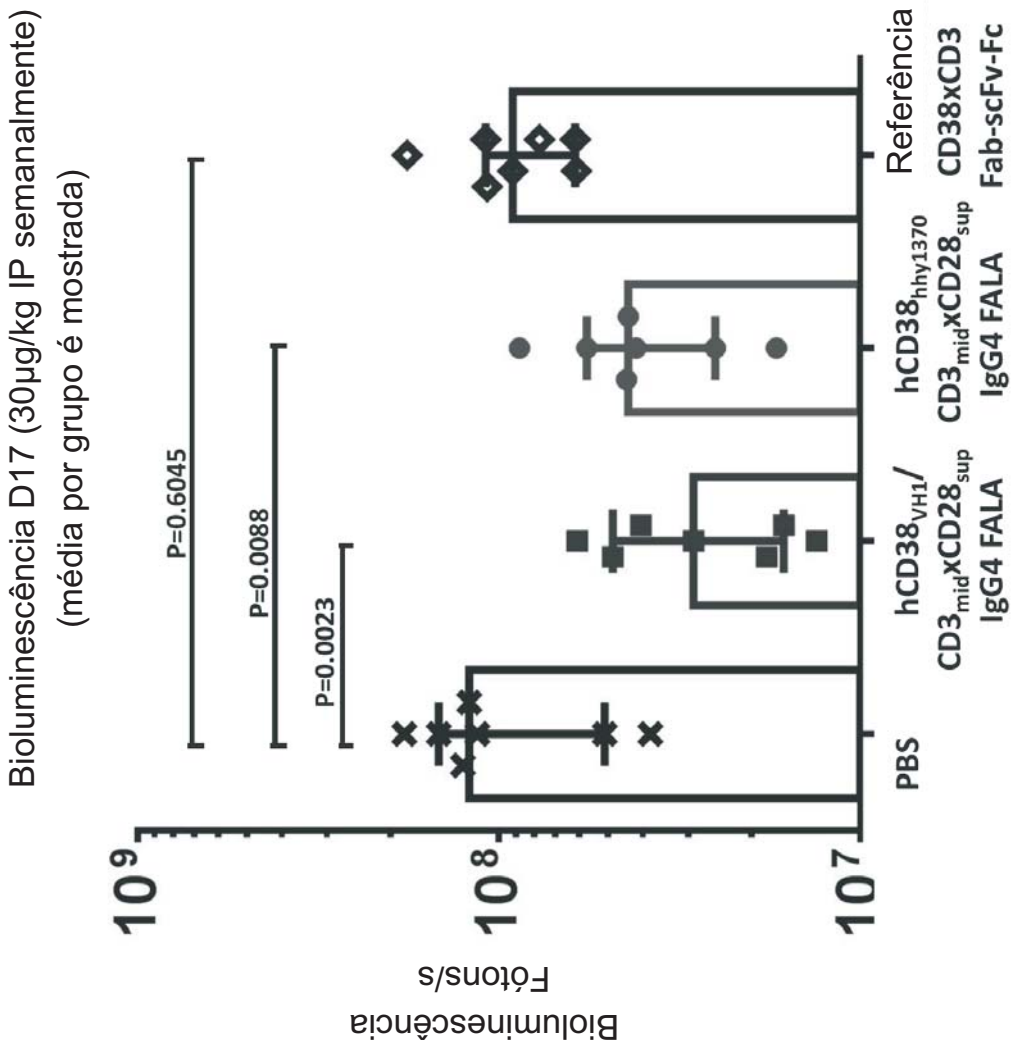


FIG. 23C

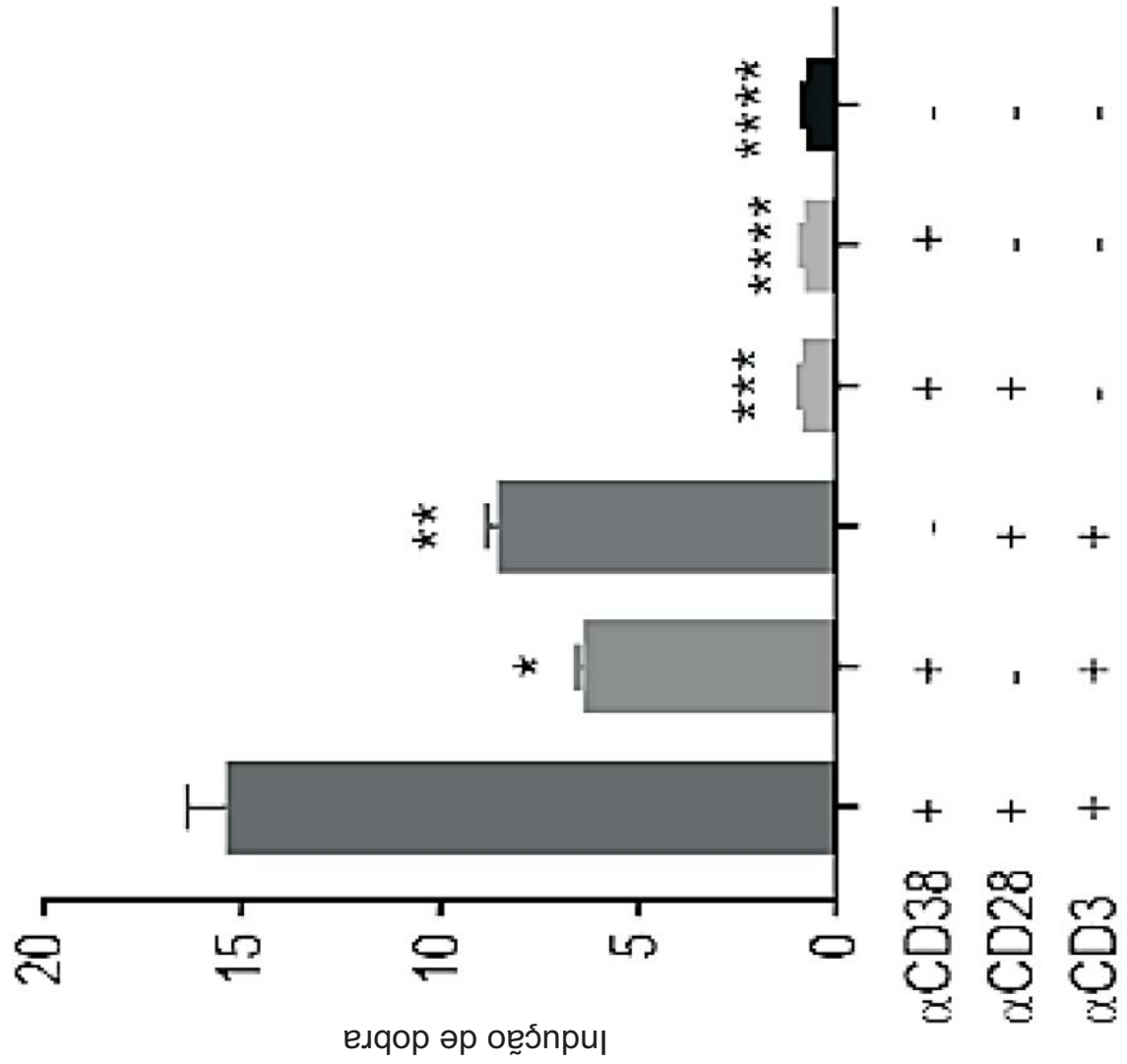


FIG. 24A

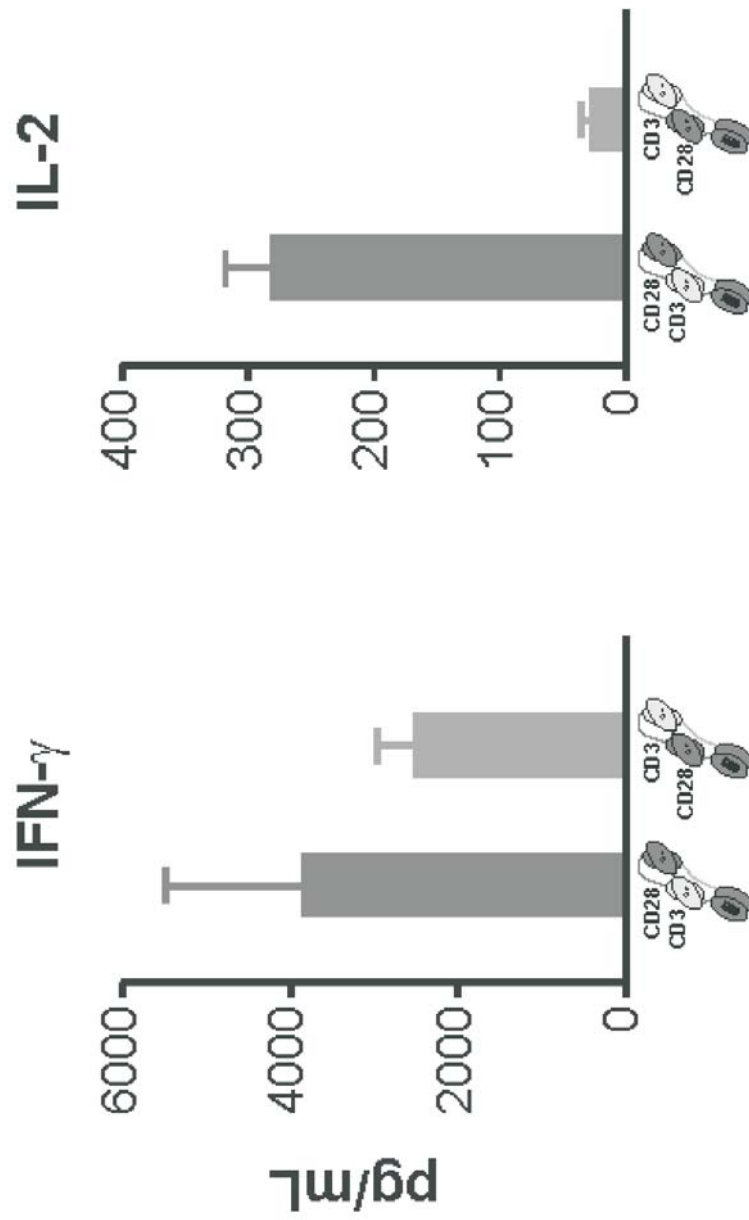
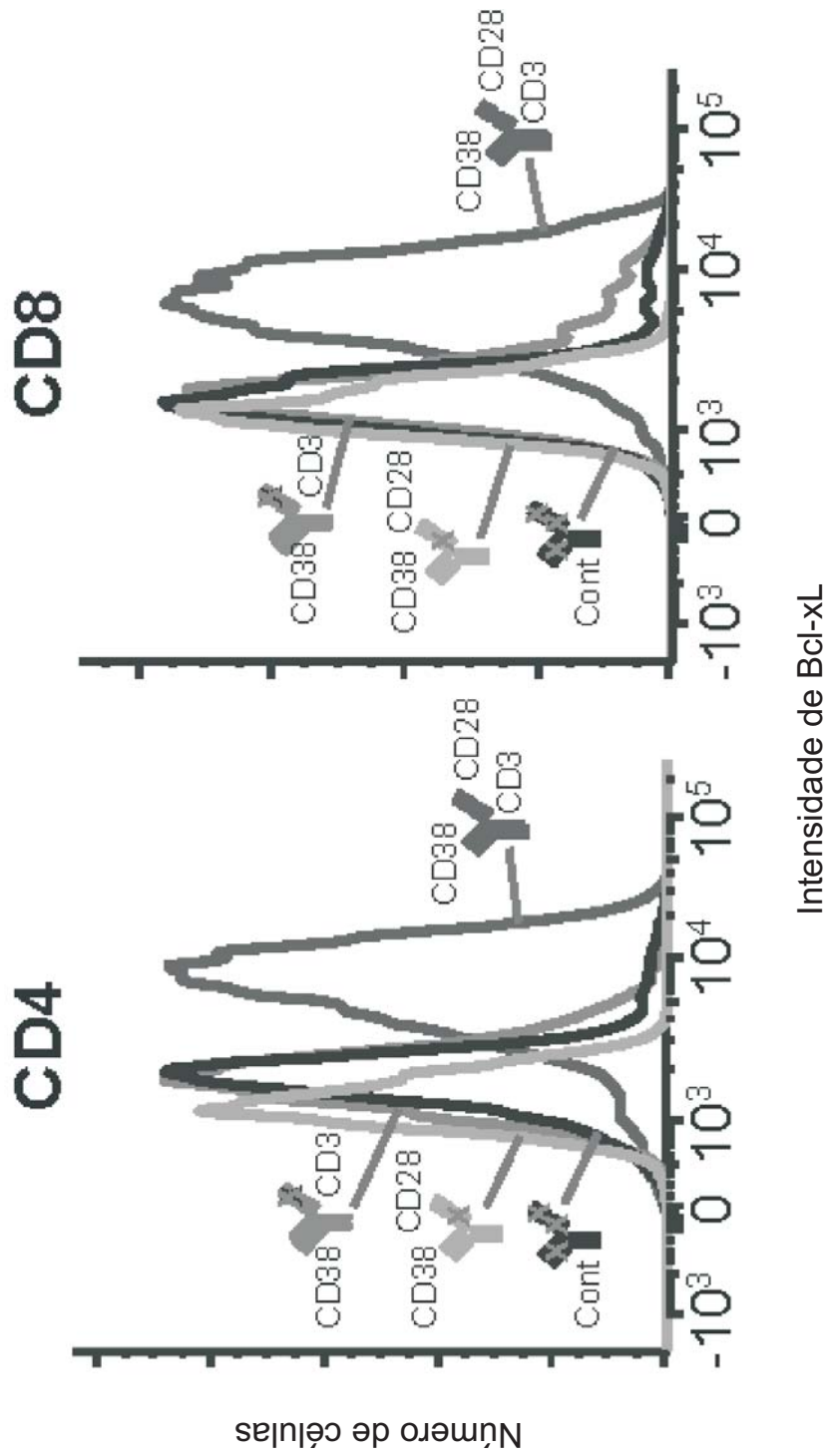


FIG. 24B

**FIG. 25**

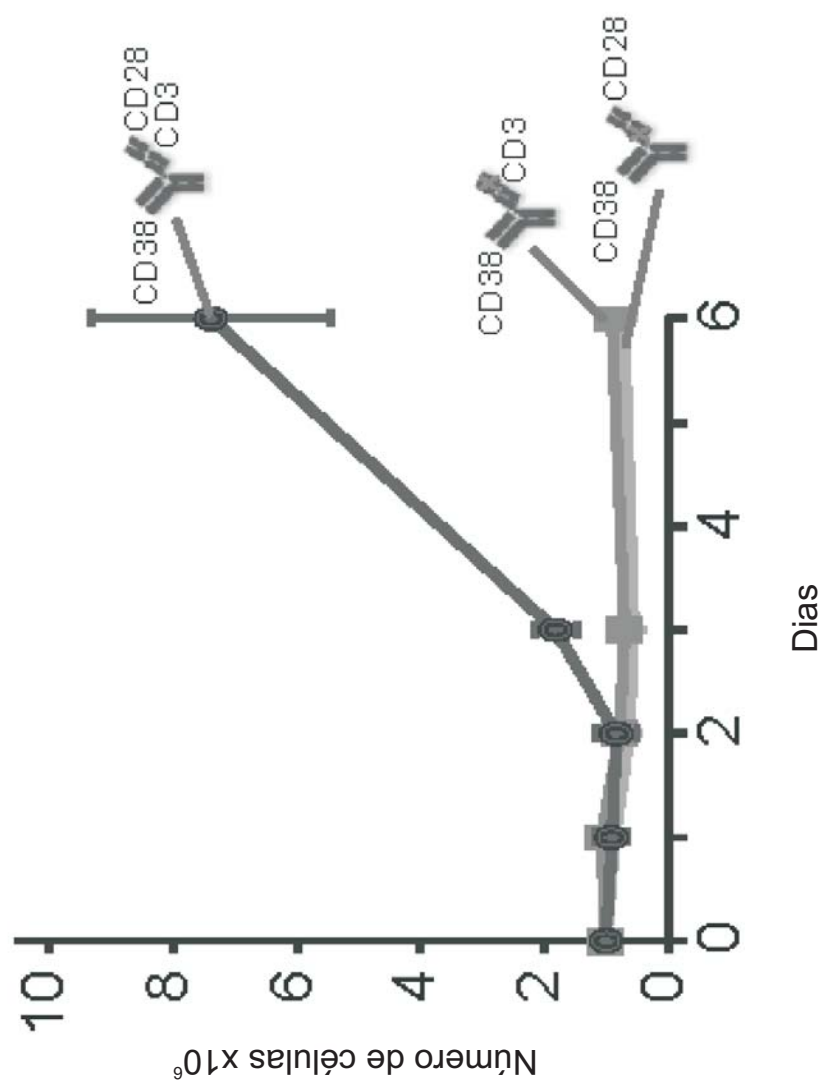


FIG. 26

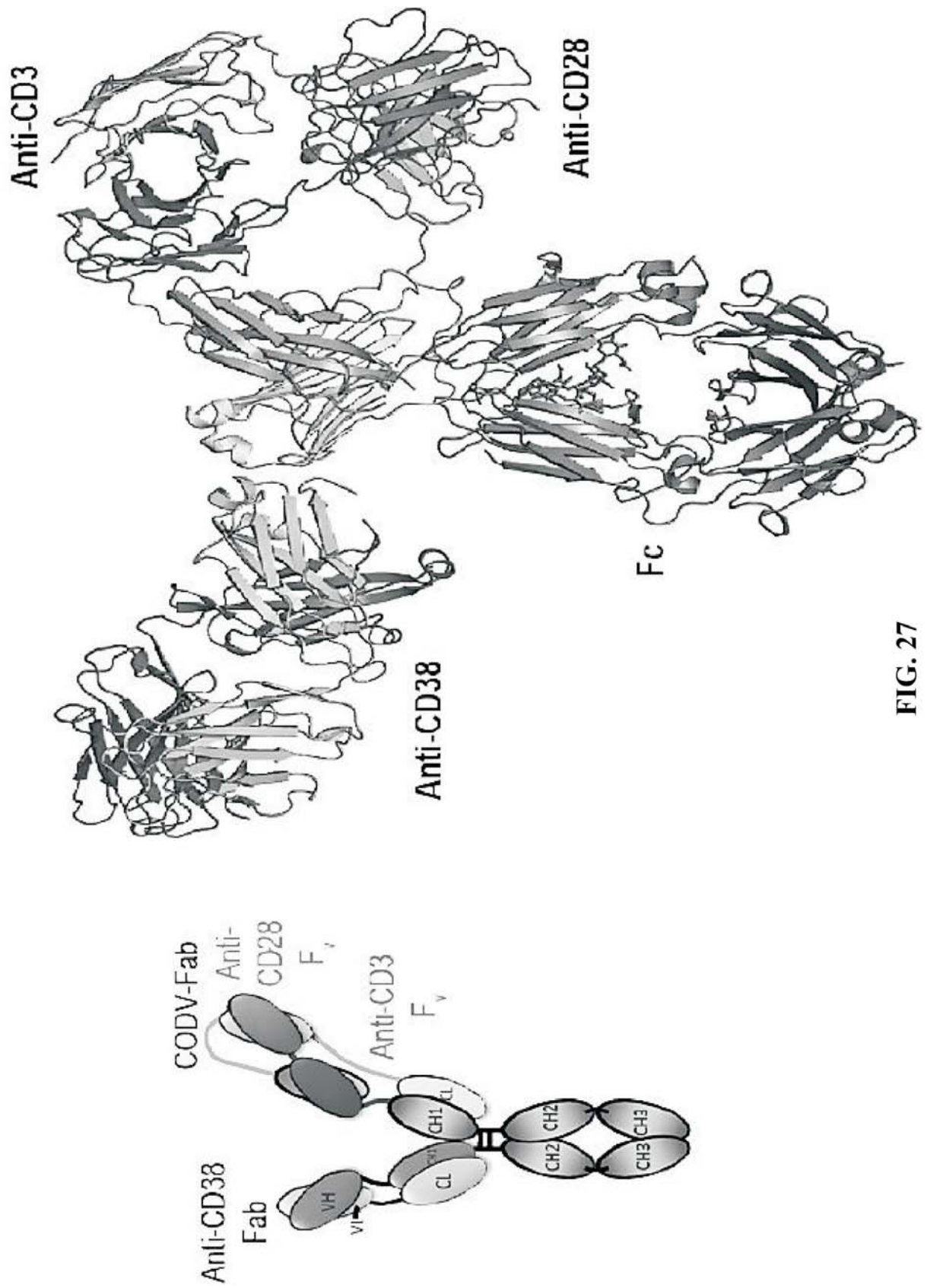


FIG. 27

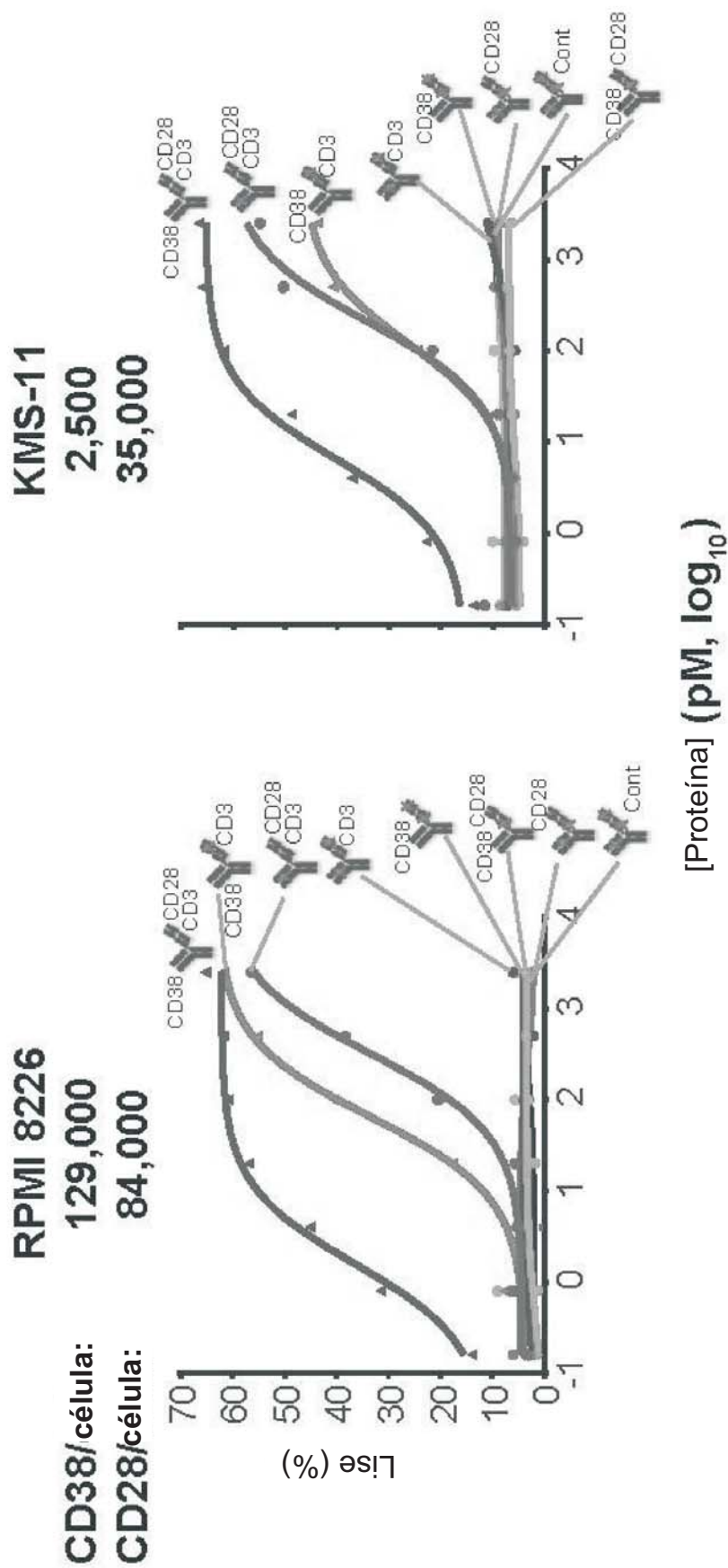


FIG. 28A

FIG. 28B

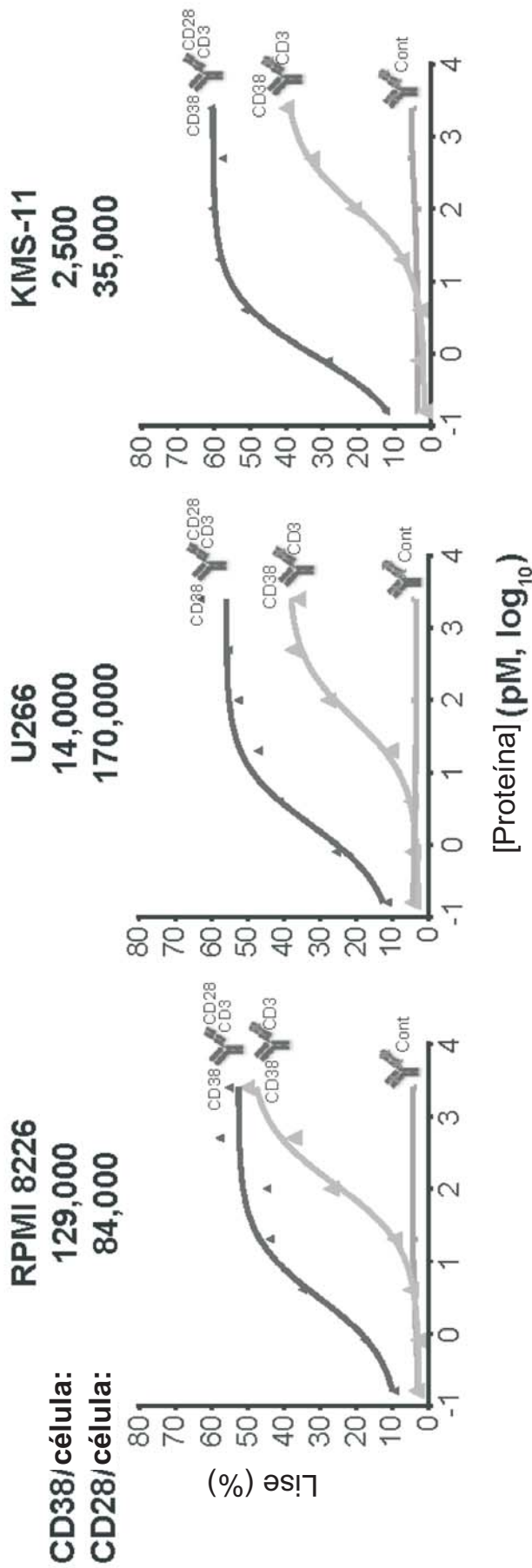


FIG. 29A

FIG. 29B

FIG. 29C

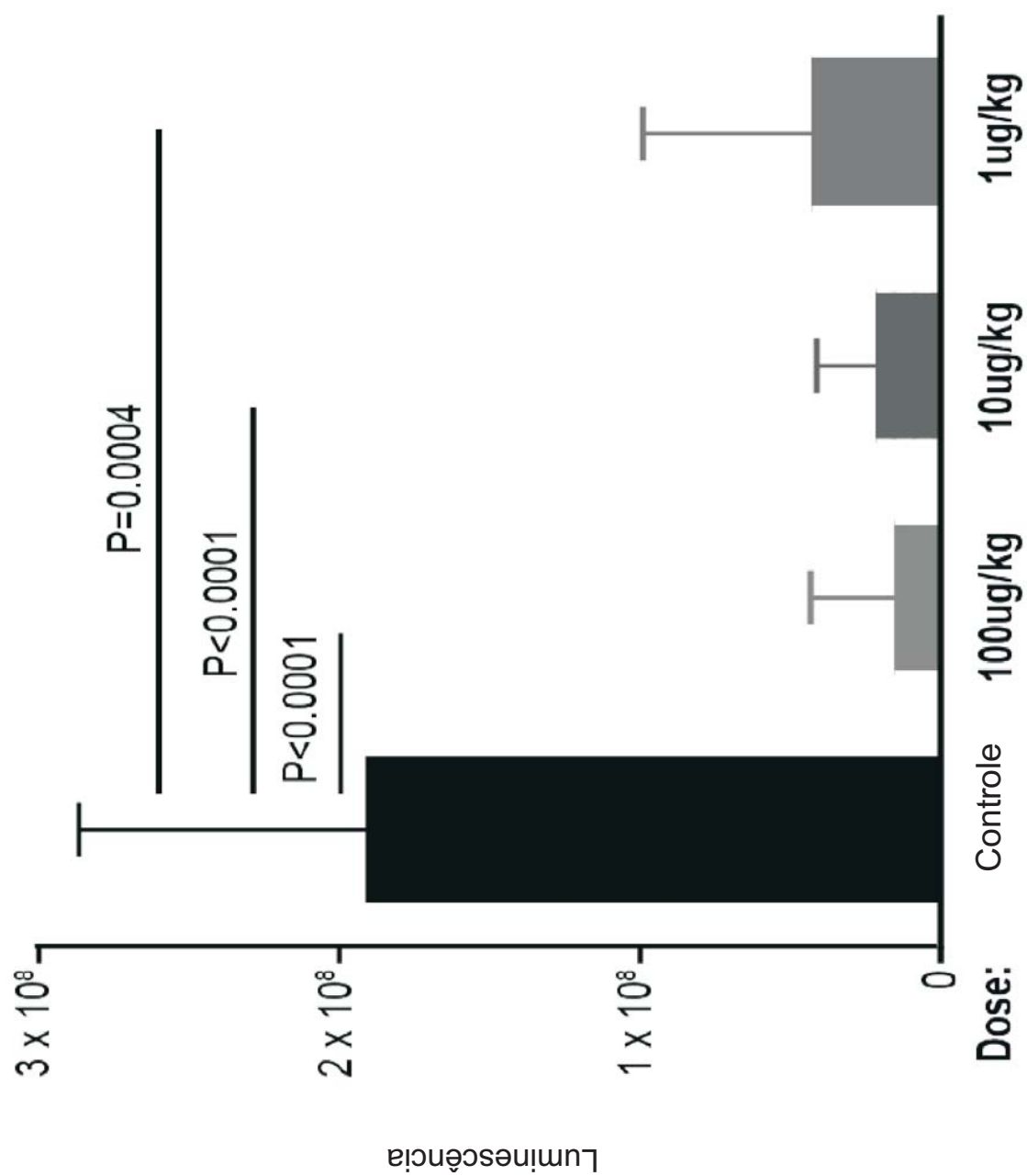


FIG. 30

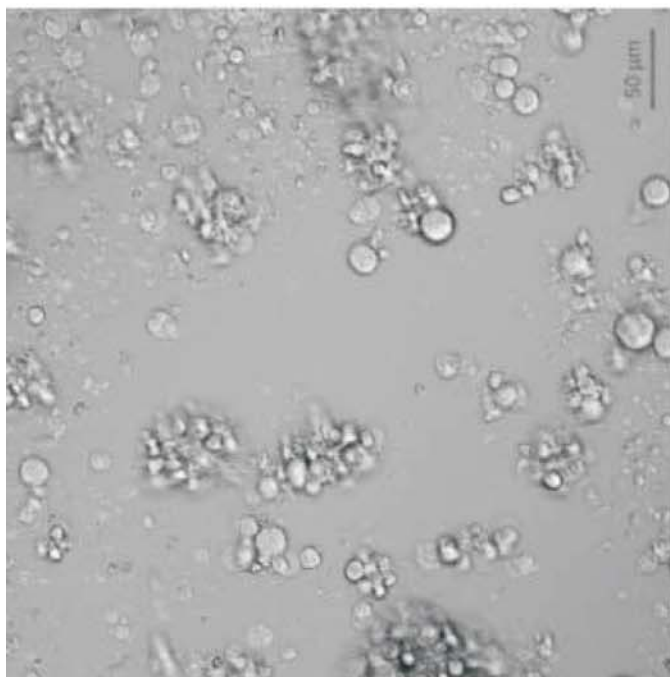


FIG. 31B

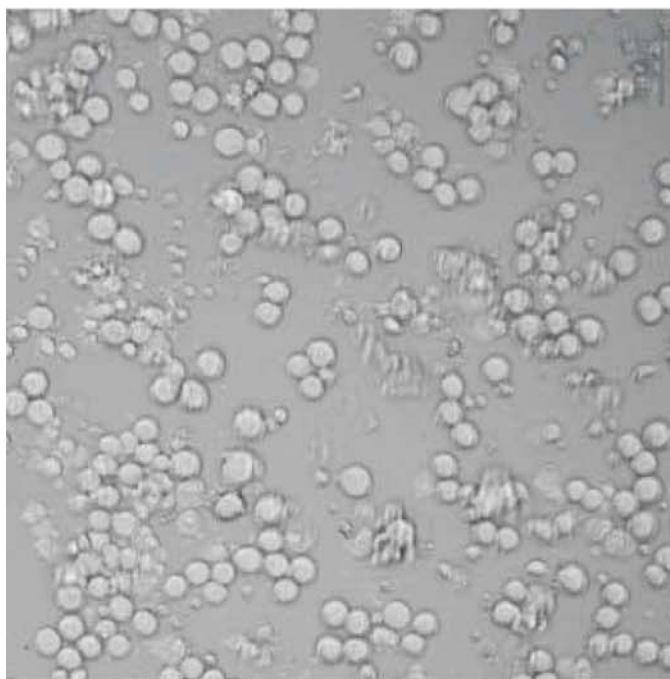


FIG. 31A

Tipo selvagem	
IgG1	CPPCPAPELLGGPS
IgG2	CPPCPAPPVAG-PS
IgG4	CPPCPAPEFLGGPS
Mutante	
IgG1 LALA/P239A	CPPCPAPEAAGGPS
IgG4 PVA	CPPCPAPPVAG-PS
IgG4 FALA	CPPCPAPEAAGGPS

FIG. 32

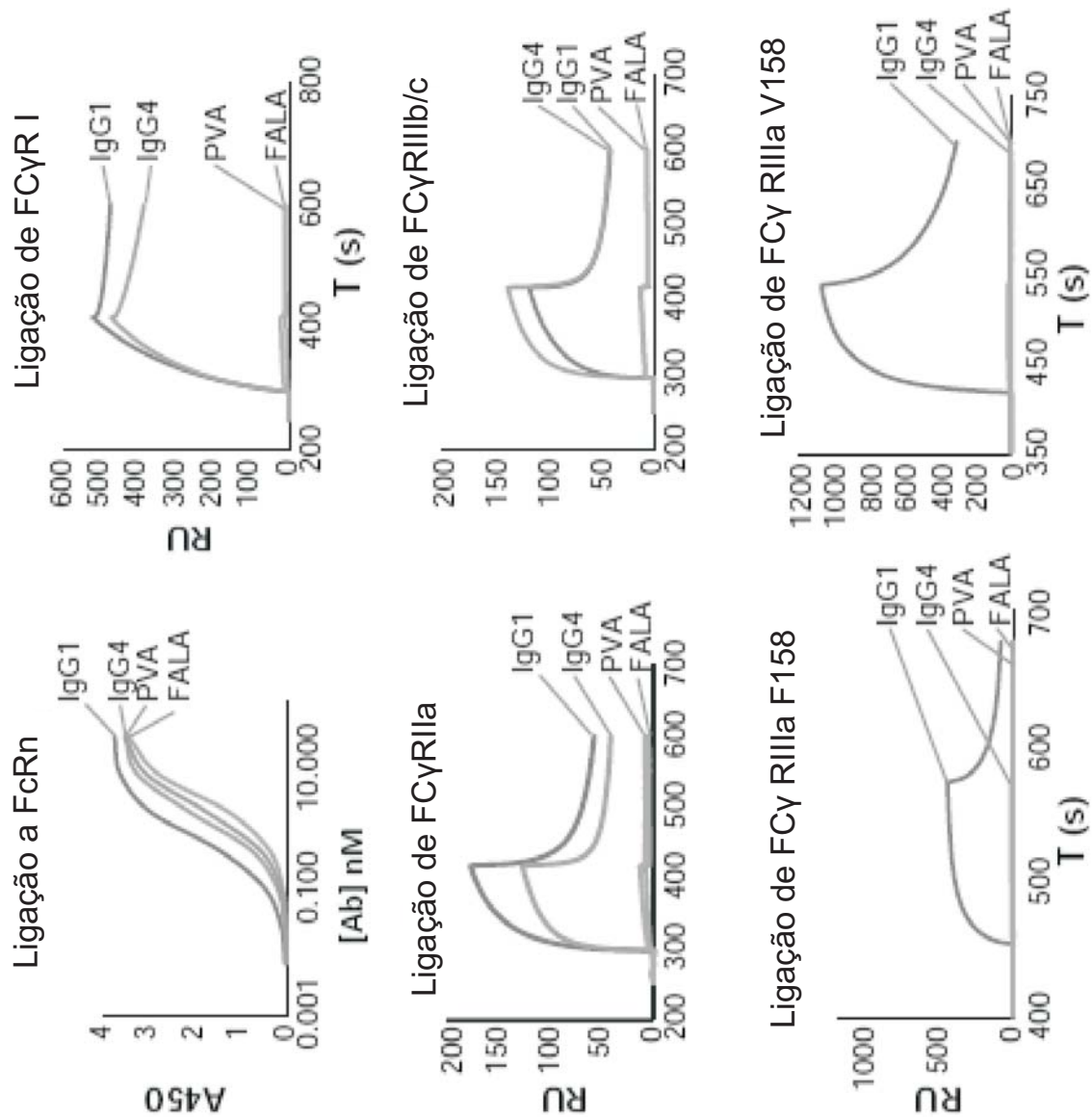


FIG. 33

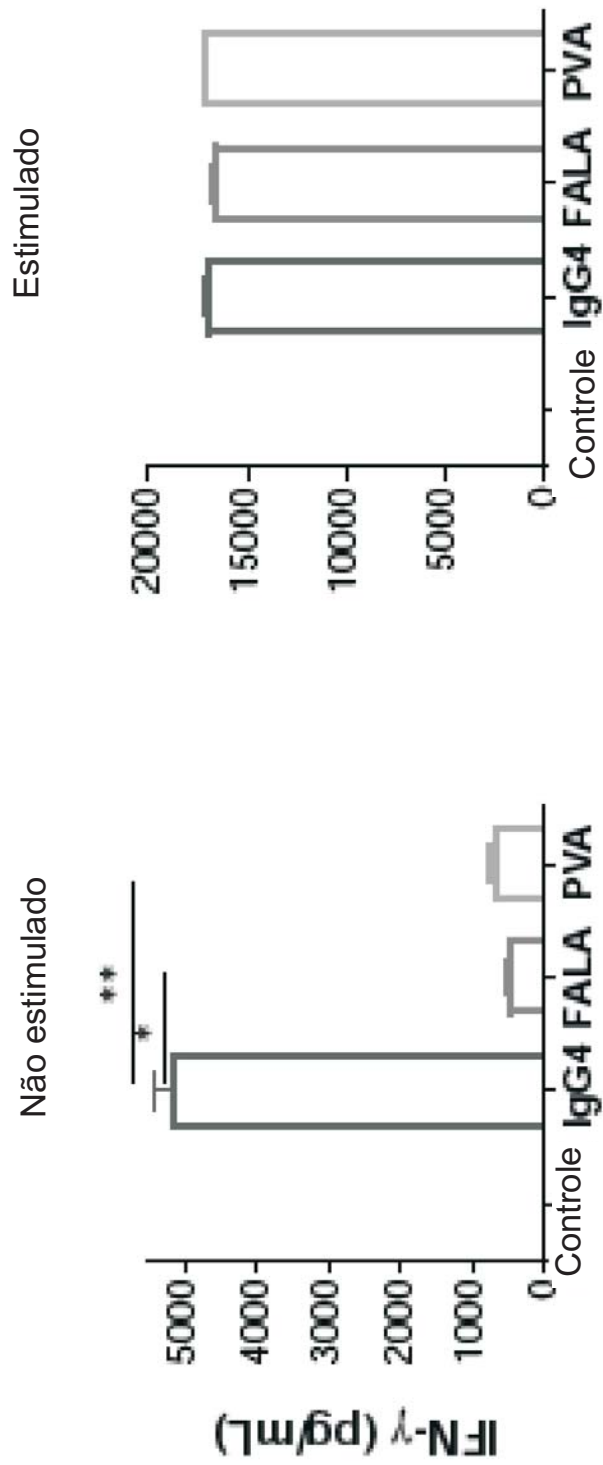


FIG. 34

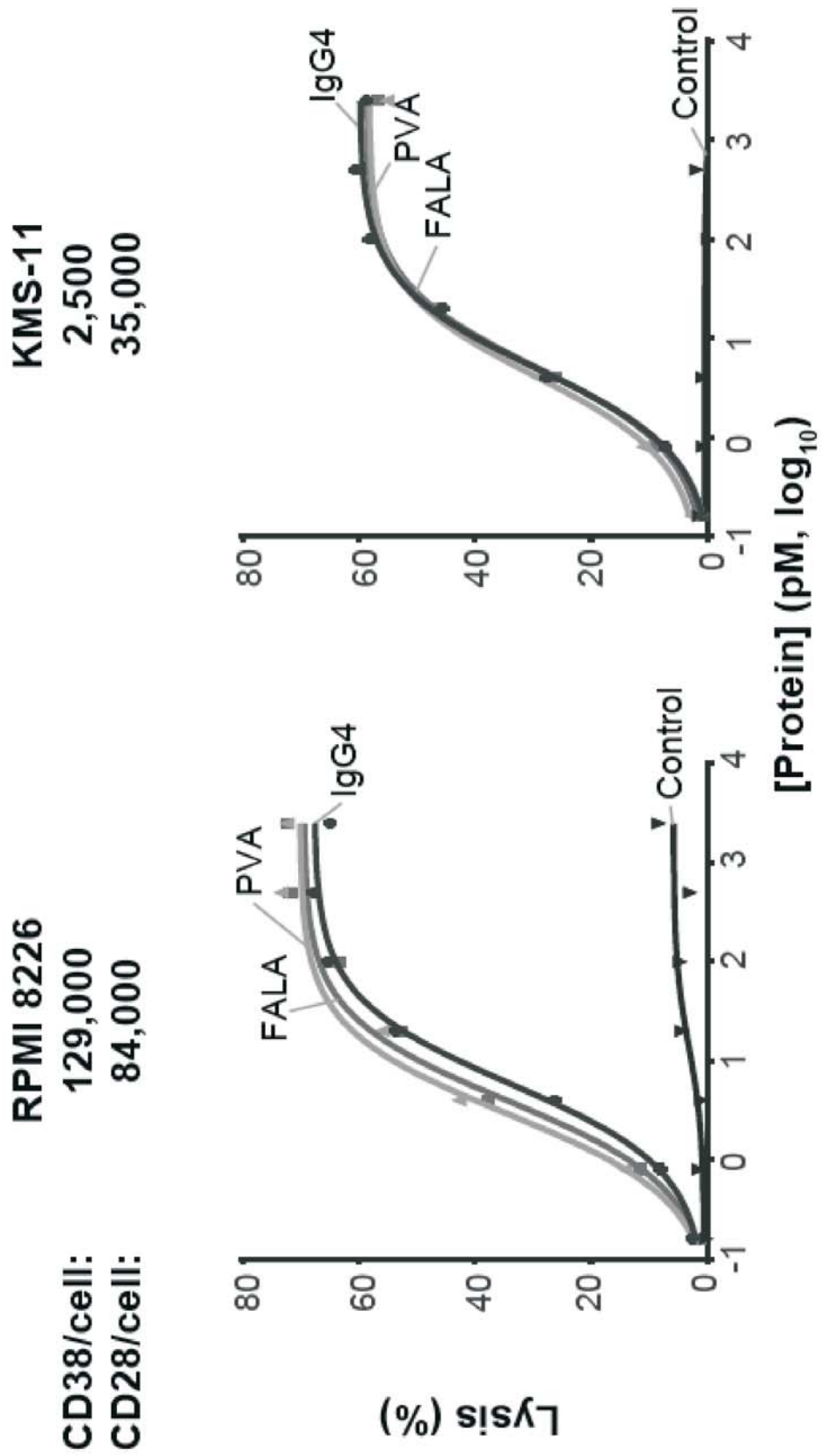


FIG. 35

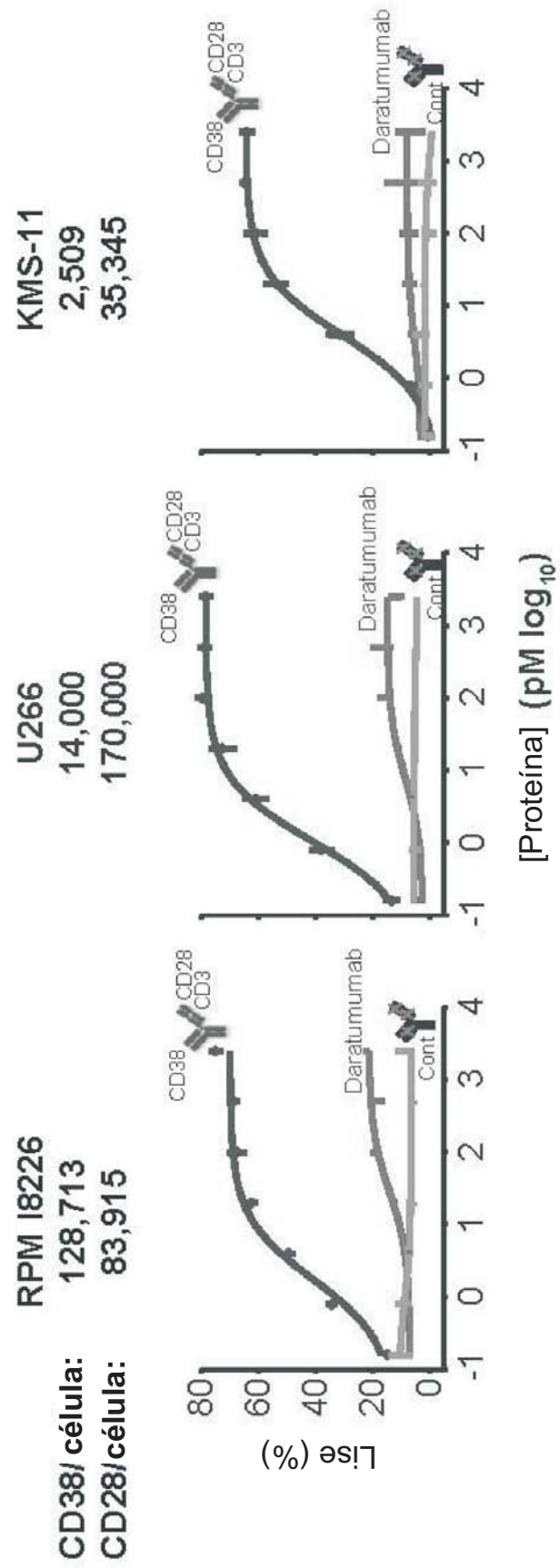
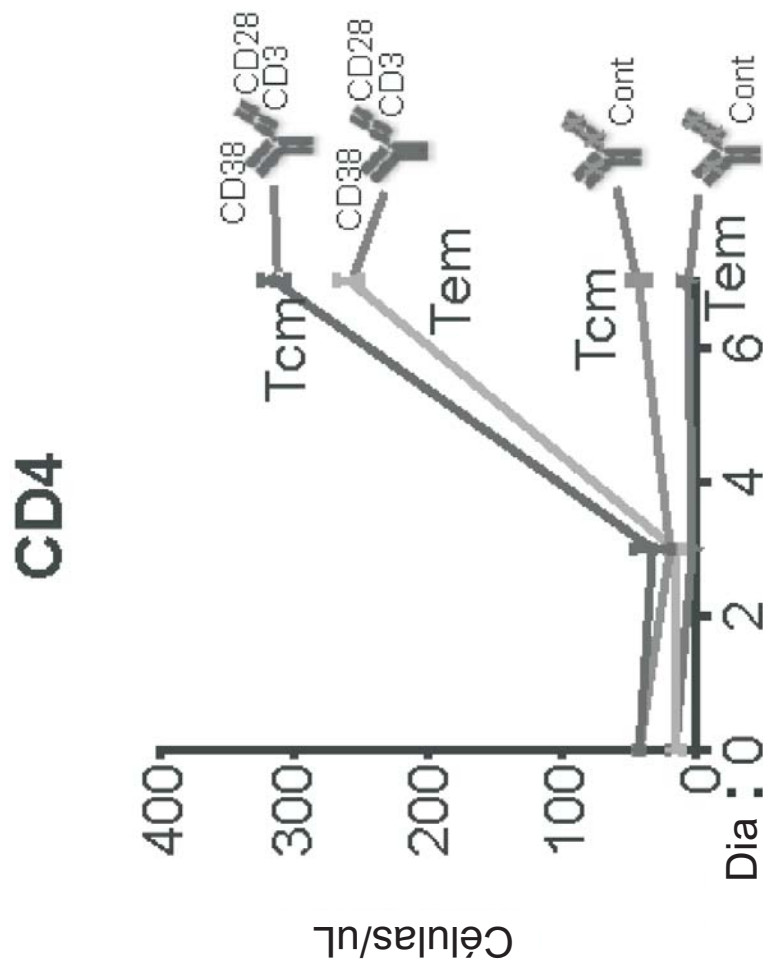


FIG. 36

**FIG. 37A**

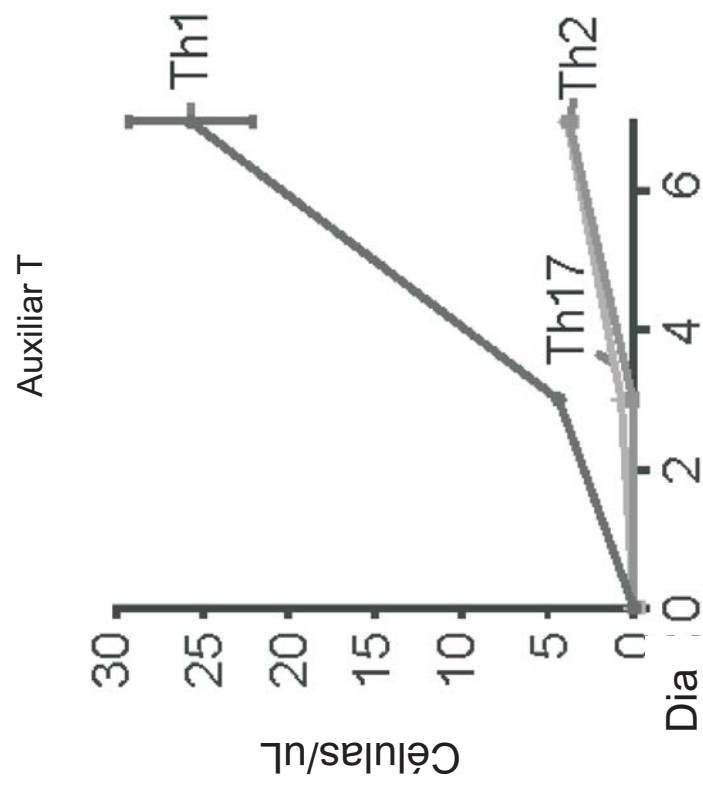
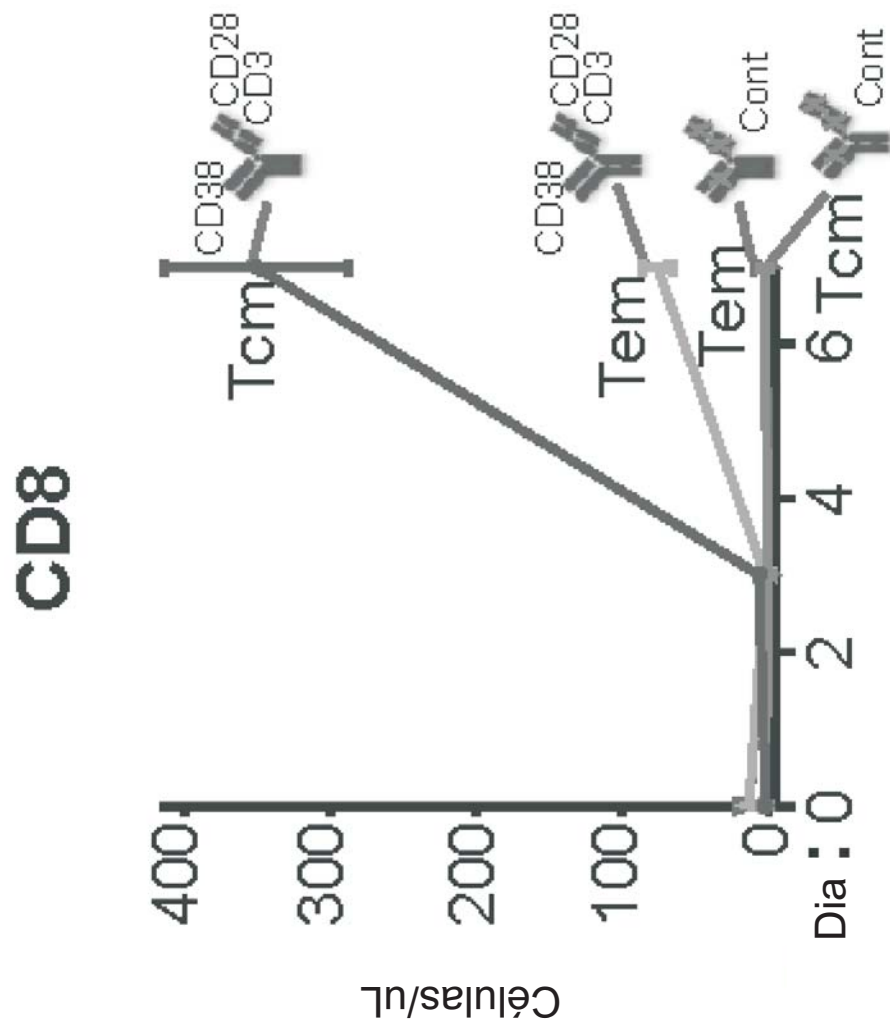
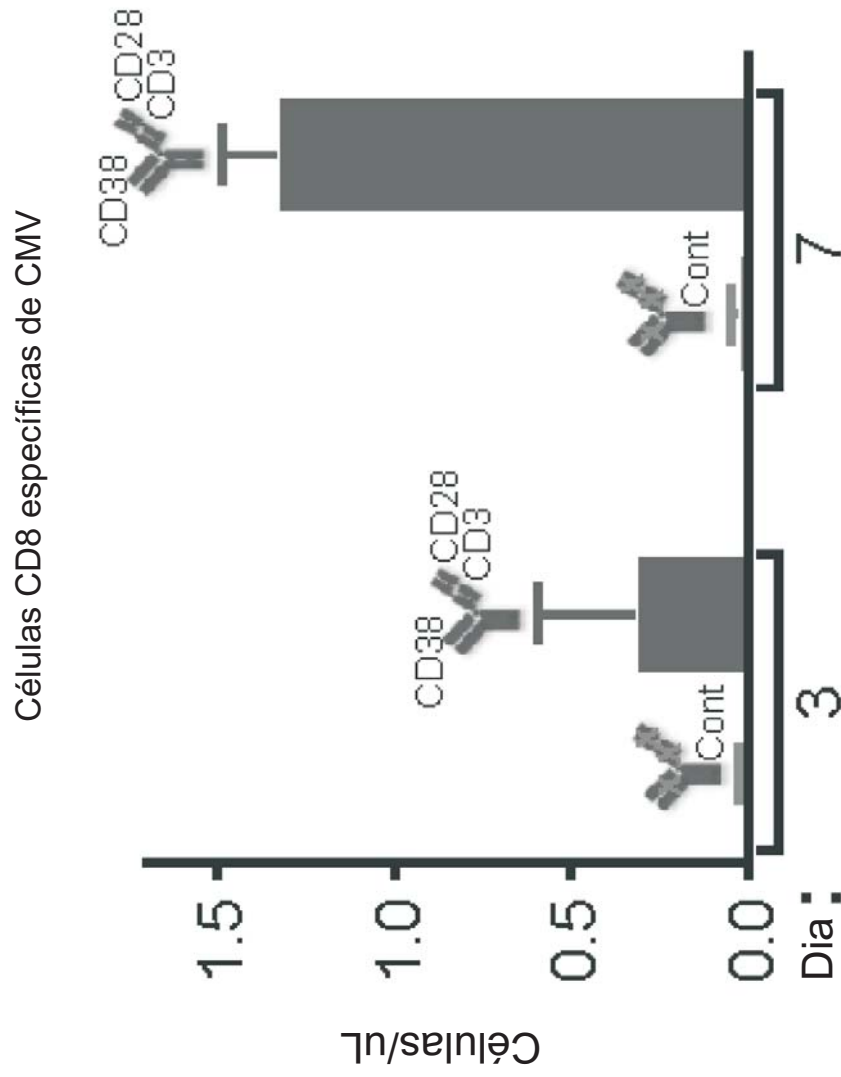


FIG. 37B

**FIG. 37C**

**FIG. 37D**

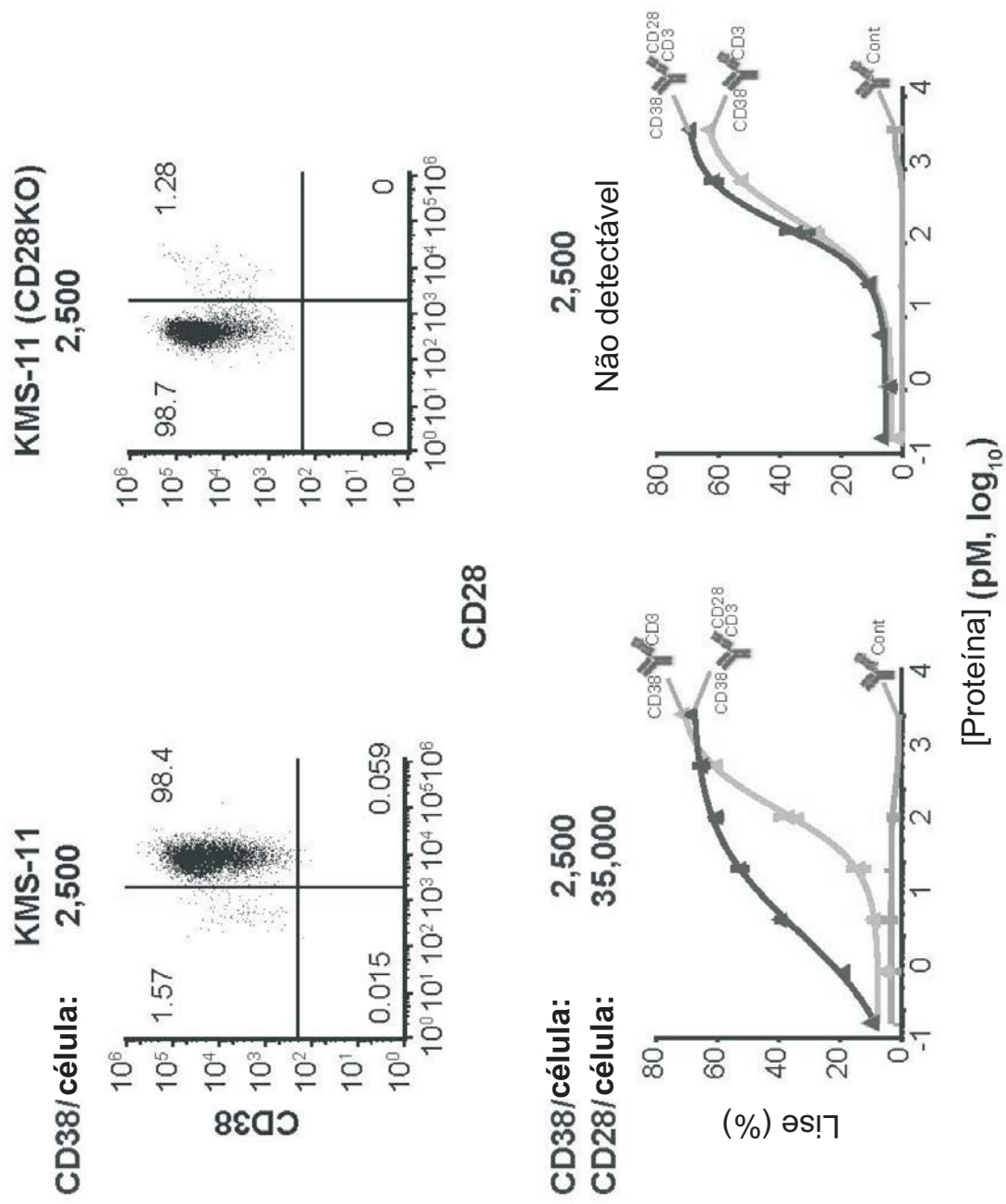


FIG. 38

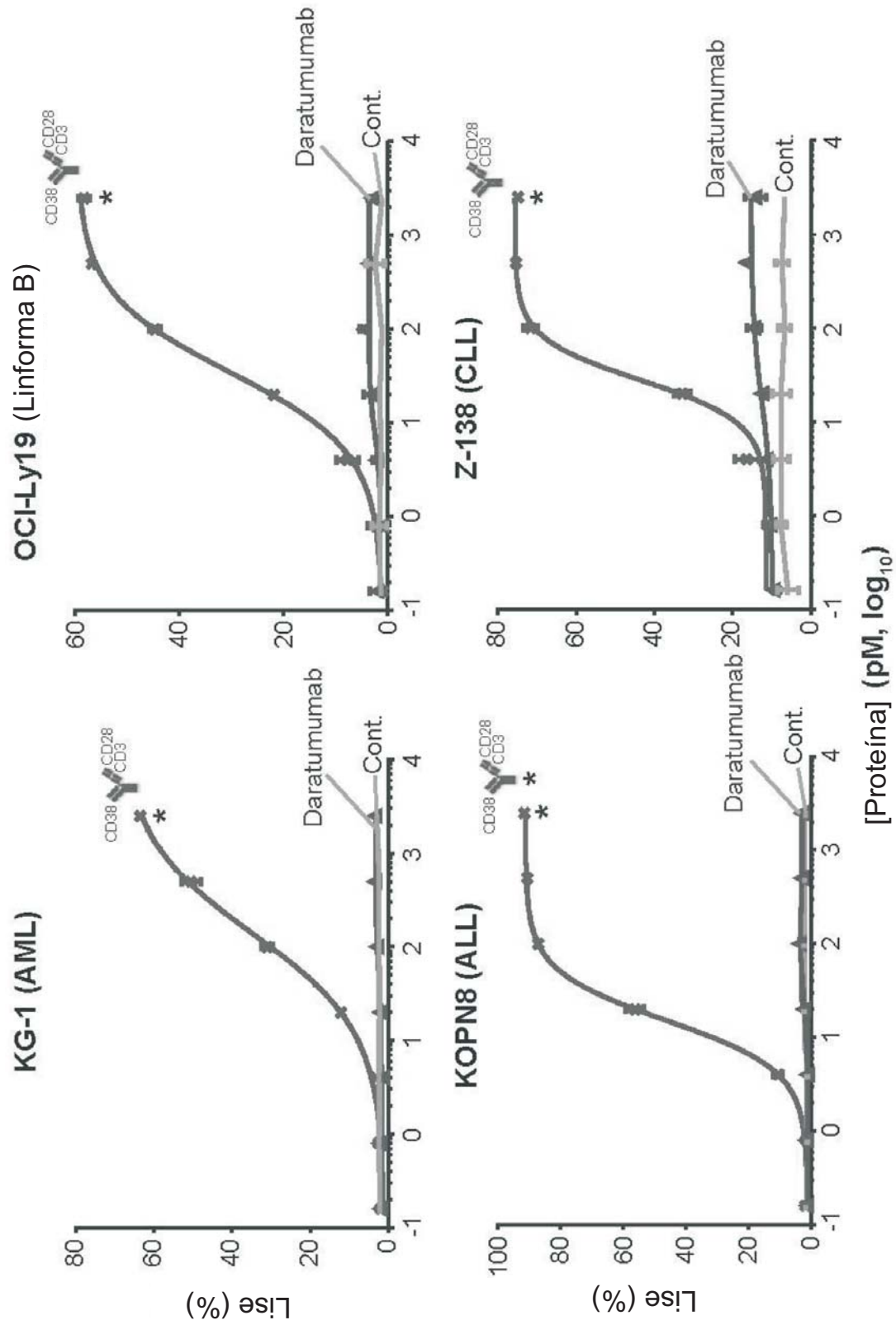


FIG. 39

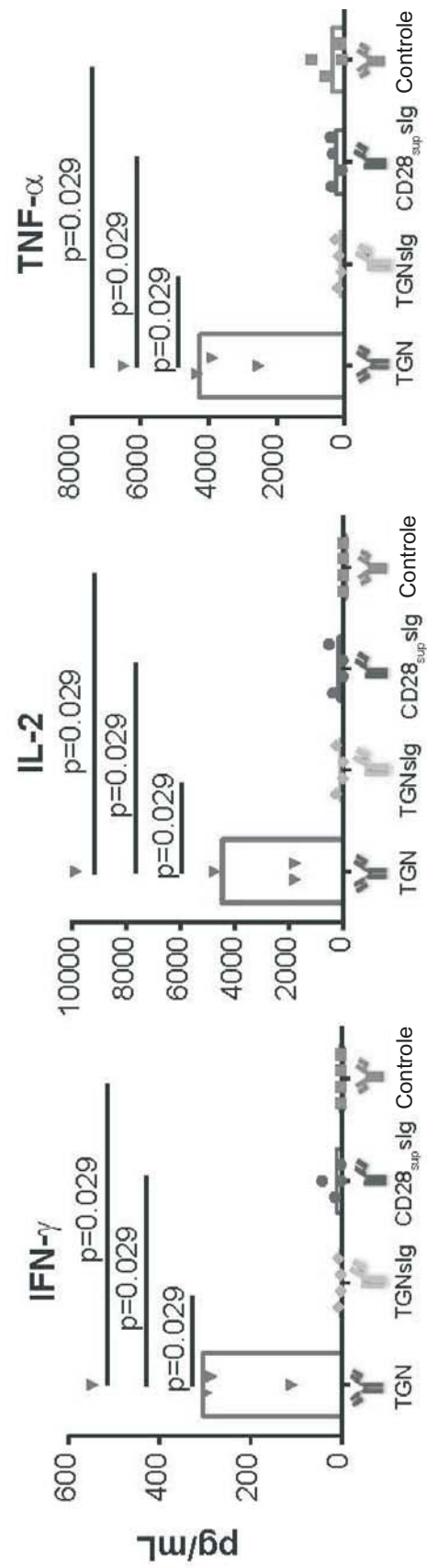


FIG. 40

RESUMO

Patente de Invenção: **"ANTICORPOS ANTI-CD38 E MÉTODOS DE USO"**.

A presente invenção refere-se as proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38, por exemplo, polipeptídeos CD38 humanos e de macaco cinomolgo. Por exemplo, as proteínas de ligação podem ser proteínas de ligação monoespecíficas, biespecíficas ou triespecíficas com pelo menos um domínio de ligação a antígeno que liga um polipeptídeo CD38. A descrição também provê métodos para produzir proteínas de ligação que ligam polipeptídeos CD38 e usos de tais proteínas de ligação.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P246328.TXT
- Data de Geração do Código: 08/04/2020
- Hora de Geração do Código: 08:55:39
- Código de Controle:
 - Campo 1: 74C4F2465E78D20C
 - Campo 2: 9C53BDE69BAE65FF