

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 579**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2018 PCT/US2018/055084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2019 WO19074973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2018 E 18792827 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2024 EP 3694882**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD38 y combinaciones con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28**

30 Prioridad:

10.10.2017 US 201762570655 P

11.10.2017 US 201762570660 P

24.05.2018 US 201862676221 P

03.08.2018 EP 18187186

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.11.2024

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
46 avenue de la Grande Armée
75017 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**WU, LAN;
XU, LING;
SEUNG, EDWARD;
WEI, RONNIE;
NABEL, GARY;
YANG, ZHI-YONG;
DABDOUBI, TARIK;
CAMERON, BÉATRICE;
LEMOINE, CENDRINE y
PRADES, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 2 986 579 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD38 y combinaciones con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28

5 Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/570.655, presentada el 10 de octubre de 2017; la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/570.660, presentada el 11 de octubre de 2017; la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 62/676.221, presentada el 24 de mayo de 2018; y la solicitud EP n.º EP18187186.4, presentada el 3 de agosto de 2018.

Presentación del listado de secuencias en archivo de texto ASCII

El contenido de la siguiente presentación en archivo de texto ASCII forma parte de la presente divulgación: una forma legible por ordenador (CRF) del listado de secuencias (nombre del archivo: 183952029941seqlist.TXT, fecha de registro: 8 de octubre de 2018, tamaño: 158 KB).

Campo de la invención

La divulgación se refiere a proteínas de unión que se unen a polipéptidos CD38 (por ejemplo, polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero), que incluyen proteínas de unión mono-específicas o bio-específicas con al menos un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, así como polinucleótidos, células hospedadoras, métodos de producción y usos relacionados con las mismas.

25 Antecedentes

Los biotratamientos basados en anticuerpos monoclonales se han convertido en una importante vía para el desarrollo de nuevos fármacos. La tecnología de anticuerpos monoclonales ofrece dirección específica, administración de señalización precisa y/o carga a una población de células específica, y proporciona un efecto biológico de larga duración a través de sus funciones de Fc. Los esfuerzos en la ingeniería de anticuerpos han permitido desarrollar anticuerpos multiespecíficos que combinan las especificidades de múltiples anticuerpos monoclonales para diversas aplicaciones biológicas, ampliando el alcance del desarrollo de fármacos de anticuerpos.

CD38 es una diana farmacológica atractiva, ya que se expresa en la superficie celular de una diversidad de células tumorales linfocíticas (véase, Stevenson, G.T. (2006) Mol. Med. 12:345-346). DARZALEX® (daratumumab) es un anticuerpo anti-CD38 aprobado para su uso en el tratamiento de mieloma múltiple. Sin embargo, existe una necesidad de tratamientos dirigidos a CD38 con un modo de acción diferente y/o propiedades mejoradas, que incluyen, aunque sin limitación, alta afinidad de unión a CD38, reactividad cruzada entre polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero, unión a células de linfoma (por ejemplo, líneas celulares de linfoma de linfocitos B grandes de mieloma múltiple), y la capacidad de inducir apoptosis y/o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y actividades antitumorales mediadas por linfocitos T. El documento WO 2012/092612 se refiere a anticuerpos monoclonales anti-CD38 humano que puedan reaccionar de forma cruzada con CD38 de macaco reformateado para inducir ADCC y CDC. El documento US 2012/076782 se refiere al anticuerpo monoclonal anti-CD38 humano MOR3080, que tiene reactividad cruzada con CD38 humano y de macaco. El anticuerpo muestra actividad de ADCC y CDC. Rojkaer Lisa: Morphosys R&D day 2010, 20 de noviembre de 2010, pág. 1-8, 73-81, divulga el anticuerpo IgG1 anti-CD38 humano MOR202, que reacciona de forma cruzada con CD38 de macaco e induce ADCC. Ting Li *et al.*, Scientific Reports, 2016, 6(1), DOI: 10. 1038/srep27055 divulga nanocuerpos anti-CD38 que se unen a diferentes epítomos definidos en el dominio carboxiterminal de DC38.

50 Breve resumen

La invención se define por las reivindicaciones. Se proporcionan en este documento proteínas de unión que se unen a polipéptidos CD38 (por ejemplo, polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero), que incluyen proteínas de unión mono-específicas o bio-específicas con al menos un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38. Ventajosamente, estas proteínas de unión tienen la capacidad de reclutar linfocitos T a la proximidad de células cancerosas, posteriormente de activar linfocitos T y promover la destrucción por linfocitos T activados de células cancerosas adyacentes a través de un mecanismo de granzima/perforina, proporcionando un modo de acción diferente para la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-CD38 tales como DARZALEX® (daratumumab). Además, la capacidad de unirse a polipéptidos CD38 tanto humanos como de macaco cangrejero permite que las proteínas de unión se ensayen fácilmente en estudios toxicológicos preclínicos, por ejemplo, para evaluar sus perfiles de seguridad para su uso clínico posterior.

En algunas realizaciones, en este documento se proporcionan proteínas de unión mono-específicas que se unen a un polipéptido CD38 humano. En algunas realizaciones, las proteínas de unión reaccionan de forma cruzada con polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero. En algunas realizaciones, las proteínas de unión se unen a polipéptidos CD38 humanos de isoforma A e isoforma E. En algunas realizaciones, las proteínas de unión poseen uno

o más de los siguientes rasgos característicos (en cualquier combinación): se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como proteína purificada, como se ensaya por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como proteína purificada con una K_D de 1,5 nM o menos, como se ensaya por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, como se ensaya por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una K_D aparente de 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM o menos, como se ensaya por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como proteína purificada, como se ensaya por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como proteína purificada con una K_D de 3,5 nM o menos, como se ensaya por SPR; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, como se ensaya por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una K_D aparente de 7,5 nM o menos, como se ensaya por citometría de flujo; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como proteína purificada, como se ensaya por ELISA; se unen al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, como se ensaya por citometría de flujo; inducen apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tienen una o más mutaciones (por ejemplo, en una región Fc) que provocan unión disminuida a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones. Para ensayos ejemplares, véanse los ejemplos 1, 3 y 4. En algunas realizaciones, la K_D se mide a 4 °C o 25 °C.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona una proteína de unión que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, en donde el sitio de unión a antígeno comprende: (a) un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y (b) un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia, del extremo N al extremo C, FR1-CDR-H1-FR2-CDR-H2-FR3-CDR-H3-FR4; en donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 87) o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); en donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); en donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 94); y en donde FR4 comprende la secuencia WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno comprende: (A) un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y (b) un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia, del extremo N al extremo C, FR1-CDR-H1-FR2-CDR-H2-FR3-CDR-H3-FR4; en donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 87) o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); en donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); en donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 94); y en donde FR4 comprende la secuencia WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 96). En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y/o el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno reacciona de forma cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38

humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 2,1 nM o menos. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 humano de isoforma E que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 1,3 nM o menos.

En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína de unión es un anticuerpo quimérico o humanizado. En algunas realizaciones, la proteína de unión es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una o más cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa que comprenden una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión al receptor de Fc y/o la función efectora de la región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329A. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299 y 300 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S298N, T299A y Y300S. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S228P y R409K. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son F234A y L235A. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son E233P, F234V, L235A y una eliminación en 236. En algunas realizaciones, la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-237 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde la secuencia EFLGG se remplaza por PVAG. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende un fragmento de anticuerpo F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv o scFv. En algunas realizaciones, la proteína de unión se conjuga con un agente citotóxico o marcador. En algunas realizaciones, la proteína de unión es una proteína de unión biespecífica que comprende el primer sitio de unión a antígeno que se une al polipéptido CD38 y un segundo sitio de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un polinucleótido que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un vector que comprende un polinucleótido que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona una célula hospedadora que comprende los polinucleótidos, el polinucleótido o el vector de una cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones, en este documento se proporciona un método de producción de una proteína de unión, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las realizaciones anteriores de manera que se produzca la proteína de unión. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar la proteína de unión de la célula hospedadora.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona al menos una proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del cáncer en un paciente. En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión se coadministra con un agente quimioterápico. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma de linfocitos B. En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano. En algunas realizaciones, el paciente se selecciona para el tratamiento porque las células del cáncer expresan un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, como se expone en SEQ ID NO: 105) en su superficie celular. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y CD28. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y no expresan CD28.

En algunas realizaciones, en este documento se proporciona al menos una proteína de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores o la composición farmacéutica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en la prevención y/o tratamiento del cáncer en un paciente (por ejemplo, un paciente que lo necesite, tal como un paciente con cáncer). En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión debe coadministrarse con un agente quimioterápico. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma

de linfocitos B. En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano. En algunas realizaciones, el paciente se selecciona para el tratamiento porque las células del cáncer expresan un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, como se expone en SEQ ID NO: 105) en su superficie celular. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y CD28. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y no expresan CD28.

Debe entenderse que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en este documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán para un experto en la materia. Estas y otras realizaciones de la invención se describen además por la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1A** muestra la unión de anticuerpos mAb1 anti-CD38 (parte superior) e isatuximab (parte inferior) a células de linfoma humano SU-DHL-8 o células de mieloma múltiple humano MOLP-8 usando citometría de flujo.

La **figura 1B** muestra los resultados de ensayos de unión a citometría de flujo que examinan la unión de anticuerpos mAb1 anti-CD38 o isatuximab (no se observa unión) a células que expresan CD38 de macaco cangrejero en su superficie.

Las **figuras 2A-2I** muestran los resultados de ensayos que caracterizan la unión de anticuerpos anti-CD38 a polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero. La **figura 2A** muestra la unión de anticuerpo mAb2 humanizado anti-CD38 a CD38 humano soluble (parte superior, "hCD38::Histag") o CD38 de macaco cangrejero (parte superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, así como la unión de mAb2 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, como se indica) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior, como se indica) por citometría de flujo. La **figura 2B** muestra la unión de mAb2 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior) por resonancia de plasmones superficiales (SPR). La **figura 2C** muestra la unión de anticuerpo mAb3 humanizado anti-CD38 a CD38 humano soluble (parte superior, "hCD38::Histag") o CD38 de macaco cangrejero (parte superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, así como la unión de mAb3 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, como se indica) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior, como se indica) por citometría de flujo. La **figura 2D** muestra la unión de mAb3 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior) por SPR. La **figura 2E** muestra la unión de anticuerpo mAb5 humanizado anti-CD38 a CD38 humano soluble (parte superior, "hCD38::Histag") o CD38 de macaco cangrejero (parte superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, así como la unión de mAb5 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, como se indica) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior, como se indica) por citometría de flujo. La **figura 2F** muestra la unión de mAb5 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior) por SPR. La **figura 2G** muestra la unión de anticuerpo hhy1370 humano anti-CD38 a CD38 humano soluble (parte superior, "hCD38::Histag") o CD38 de macaco cangrejero (parte superior, "cynoCD38::Histag") por ELISA, así como la unión de hhy1370 a la superficie de células que expresan CD83 humano (parte inferior, como se indica) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior, como se indica) por citometría de flujo. La **figura 2H** muestra la unión de hhy1370 a CD38 humano (parte superior) o CD38 de macaco cangrejero (parte inferior) por SPR. La **figura 2I** resume los datos de unión de los experimentos de ELISA, SPR y FACS, así como el porcentaje de identidad de cada dominio VH ("H") o VL ("L") de anticuerpo con la secuencia de la región V humana desde la parte superior hasta la parte inferior corresponde a mAb2, mAb3, mAb 4, mAb 5 y mAb6 en la última línea (1195 HHKK-3 no se ha descrito por su secuencia de aminoácidos de VL/VH en el texto a continuación).

La **figura 2J** muestra la inducción dependiente de la concentración de la apoptosis de células SU-DHL-8 por mAb7 y mAb1 después de incubación durante 72 horas a 37 °C.

La **figura 2K** muestra la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de isatuximab y mAb1 contra células SU-DHL-8 en presencia de células NK92.

La **figura 2L** muestra la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) dependiente de la concentración de isatuximab (derecha) y mAb1 (izquierda) contra células SU-DHL-8 en presencia de células NK92 después de 4 horas a 37 °C.

Las **figuras 2M-2Q** muestran los resultados de ensayos de inducción de apoptosis usando los anticuerpos anti-CD38 indicados contra células tumorales SU-DHL-8. La apoptosis se cuantificó midiendo la absorción doble de anexina V y yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La **figura 2M** muestra el porcentaje de células apoptóticas inducidas por cada anticuerpo. Las **figuras 2N-2Q** muestran la inducción dependiente de la dosis de apoptosis en células de linfoma SU-DHL-8 por anticuerpos anti-CD38 mAb2 (**figura 2N**), mAb3 (**figura 2O**), mAb4 (**figura 2P**) y mAb5 (**figura 2Q**), así como la CI50 para cada anticuerpo.

La **figura 3A** proporciona una representación esquemática de una proteína de unión trispecífica que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a tres proteínas diana: CD28, CD3 y CD38. Un primer par de polipéptidos posee dominios variables dobles que tienen una orientación cruzada (VH1-

VH2 y VL2-VL1) que forman dos sitios de unión a antígeno que reconocen CD3 y CD28, y un segundo par de polipéptidos posee un único dominio variable (VH3 y VL3) que forma un único sitio de unión a antígeno que reconoce CD38. La proteína de unión trispecífica mostrada en la **figura 3A** usa una región constante de IgG4 con una mutación de "botones en ojales", donde el botón está en el segundo par de polipéptidos con un único dominio variable.

La **figura 3B** proporciona una representación esquemática de un ensayo basado en SPR para examinar la capacidad de cada dominio de unión a antígeno de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3 de unirse a su antígeno afín.

La **figura 3C** muestra los resultados de ensayos basados en SPR para examinar la unión a CD38 de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3. La unión de CD38 humana a proteínas de unión trispecíficas se examinó en solitario (parte superior izquierda), después de preunión con CD3 (parte superior central), después de preunión con CD28 (parte superior derecha), después de preunión a CD3 y luego a CD28 (parte inferior izquierda), o después de preunión a CD28 y luego a CD3 (parte inferior derecha).

La **figura 4** muestra la unión secuencial de polipéptidos CD3, CD28 y CD38 humanos a proteínas de unión trispecíficas anti-CD38/anti-CD28/anti-CD3, como se ensaya por SPR.

La **figura 5** resume las afinidades de unión de las proteínas de unión trispecíficas indicadas contra sus antígenos afines (CD3, CD28 y CD38 humanos) medidas por SPR.

La **figura 6A** compara la afinidad aparente del dominio de unión a antígeno de isatuximab en formato IgG1 humana (2.^a hoja) o en un formato de proteína de unión trispecífica con los dominios de unión a antígeno isatuximab, anti-CD28 y anti-CD3 (formato de acuerdo con la **figura 3A**; 1.^a hoja) para polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior), como se ensaya por citometría de flujo.

La **figura 6B-6D** compara las afinidades aparentes de la proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid}, CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid}, o anticuerpo monoespecífico mAb2 anti-CD38 para la unión a células que expresan polipéptidos CD38 humanos o de macaco cangrejero, como se ensaya por citometría de flujo. La **figura 6B** muestra la unión de la proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior). La **figura 6C** muestra la unión de la proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}×CD28_{cvn}×CD3_{mid} a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior). La **figura 6D** muestra la unión del anticuerpo monoespecífico mAb2 anti-CD38 a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior).

La **figura 6E** compara las afinidades aparentes de la proteína de unión trispecífica CD38_{HVY1370}×CD28_{sup}×CD3_{mid} o el anticuerpo monoespecífico mAb6 anti-CD38 para la unión a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior), como se ensaya por citometría de flujo.

La **figura 6F** resume la afinidad de unión de las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38×anti-CD28×anti-CD3 indicadas por CD38 humano, medida por SPR o citometría de flujo (FACS).

La **figura 6G** muestra la afinidad aparente de la proteína de unión trispecífica ΔCD38_{VH1}×CD28_{sup}×CD3_{mid} que carece del dominio de unión a antígeno anti-CD38 para la unión a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior) o de macaco cangrejero (parte inferior), como se ensaya por citometría de flujo.

Las **figuras 7A y 7B** muestran los resultados de un ensayo ELISA que determina las afinidades de unión de diversas proteínas de unión trispecíficas IgG4 anti-CD38 × CD28 × CD3, o anticuerpos de control, a polipéptidos CD3, CD28 y CD38 humanos y de macaco de la India.

Las **figuras 8A-8D** muestran los resultados de la destrucción específica mediada por anticuerpos de células CD38⁺ por PBMC de tres donadores humanos diferentes usando las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38 × CD28 × CD3 indicadas y anticuerpos de control. Se muestran resultados representativos usando líneas celulares de mieloma múltiple RPMI8266 (**figura 8A**), NCI-H929 (**figura 8B**), KMS-26 (**figura 8C**) y líneas celulares KMS-11 (**figura 8D**), y los valores de CE50 se proporcionan en la tabla N. Los valores de CE50 obtenidos usando células NCI-H929, KMS-26 y KMS-11 se proporcionan en las tablas O-Q.

Las **figuras 8E y 8F** muestran los resultados de la destrucción específica mediada por anticuerpos de células CD38⁺ por PBMC de dos donadores diferentes usando las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38 × CD28 × CD3 indicadas con regiones Fc variantes y anticuerpos de control. Se muestran resultados representativos usando líneas celulares CD38⁺ KMS-11 (**figura 8D**) y U266 (**figura 8E**), y los valores de CE50 se proporcionan en las tablas Q2 y Q3.

Las **figuras 9A, 9B y 10** muestran la activación (CD69⁺) de linfocitos T humanos tratados con diversas proteínas de unión trispecíficas anti-CD38 × CD28 × CD3 o anticuerpos de control durante 24 horas. La **figura 9A** muestra la

activación (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ humanos. La **figura 9B** muestra la activación (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ humanos. La **figura 10** muestra la activación (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ humanos.

Las **figuras 11A-11B** muestran los resultados de evaluaciones de liberación de citocinas *in vitro* de PBMC humanas tratadas con las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38 × CD28 × CD3 indicadas o anticuerpos de control en función del método de placa seca como se describe en Stebbings, R. *et al.* (2007) J. Immunol. 179:3325-3331. La **figura 11A** muestra los resultados usando 5 µg/ml de los anticuerpos indicados. La **figura 11B** muestra los resultados usando 25 ng/ml de los anticuerpos indicados.

Las **figuras 12A-12E** muestran la actividad *in vivo* de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) en el modelo de ratón NSG humanizado de glóbulos sanguíneos del cordón umbilical CD34⁺ implantado con células de mieloma múltiple RPMI-8226. La **figura 12A** muestra el cambio en el volumen del tumor en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 12B** muestra el volumen promedio del tumor en el día 18 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 12C** muestra el peso promedio del tumor terminal en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 12D** muestra la curva de crecimiento promedio del tumor a lo largo del experimento en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 12E** muestra el cambio promedio en el peso corporal en múltiples puntos temporales a lo largo del experimento de ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38.

Las **figuras 13A-13F** muestran la actividad *in vivo* de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) en el modelo de ratón NSG humanizado de PBMC implantado con células de mieloma múltiple RPMI-8226. La **figura 13A** muestra el cambio en el volumen del tumor en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 13B** muestra el volumen del tumor en el día 4 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 13C** muestra el volumen del tumor en el día 21 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 13D** muestra el volumen promedio del tumor en el día 21 en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 13E** muestra el peso promedio del tumor terminal en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38. La **figura 13F** muestra el volumen promedio del tumor en múltiples puntos temporales a lo largo del experimento en ratones tratados con las concentraciones indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid) frente a ratones tratados con un anticuerpo biespecífico anti-CD3/CD38.

Las **figuras 14A-14U** muestran los resultados de un estudio de aumento de escala de la dosis (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) usando las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid), anti-CD38_(VHI) × CD28_(cvn) × CD3_(mid), anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid) y anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(cvn) × CD3_(mid) en primates no humanos. La **figura 14A** muestra la activación de linfocitos T (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ circulantes después de la administración de diferentes dosis de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14B** muestra la activación de linfocitos T (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ circulantes después de la administración de diferentes dosis de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(cvn) × CD3_(mid). La **figura 14C** muestra la activación de linfocitos T (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ circulantes después de la administración de diferentes dosis de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14D** muestra la activación de linfocitos T (CD69⁺) de linfocitos T CD3⁺ circulantes después de la administración de diferentes dosis de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(cvn) × CD3_(mid). La **figura 14E** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14F** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14G** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(cvn) × CD3_(mid). La **figura 14H** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VHI) × CD28_(cvn) × CD3_(mid). La **figura 14I** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14J** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid). La **figura 14K** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-

CD38_(hhy1370) × CD28_(cvt) × CD3_(mid). La **figura 14L** muestra los cambios en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ circulantes después de la administración de las dosis indicadas de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(cvt) × CD3_(mid). La **figura 14M** muestra los cambios en el total de linfocitos T CD4⁺ 6, 24 y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión trispecíficas indicadas. La **figura 14N** muestra los cambios en el total de linfocitos NK 6, 24 y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión trispecíficas indicadas. La **figura 14O** muestra los cambios en el total de linfocitos T CD8⁺ 6, 24 y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión trispecíficas indicadas. La **figura 14P** muestra los cambios en el total de linfocitos B 6, 24 y 48 horas después de la administración de 12,5 µg/kg de las proteínas de unión trispecíficas indicadas. La **figura 14Q** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis ascendentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VH1) × CD28_(sup) × CD3_(mid) (resultados de diferentes animales de ensayo marcados como "117065" y "117066"). La **figura 14R** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis ascendentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(VH1) × CD28_(cvt) × CD3_(mid) (resultados de diferentes animales de ensayo marcados como "117067" y "117068"). La **figura 14S** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis ascendentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid) (resultados de diferentes animales de ensayo marcados como "117069" y "117070"). La **figura 14T** muestra los cambios en los niveles de citocinas 6 horas después de la administración de las tres dosis ascendentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de la proteína de unión trispecífica anti-CD38_(hhy1370) × CD28_(cvt) × CD3_(mid) (resultados de diferentes animales de ensayo marcados como "117071" y "117072"). La **figura 14U** muestra los cambios en los niveles de citocinas 24 horas después de la administración de las tres dosis ascendentes (0,5, 2,5, 12,5 µg/kg) de las proteínas de unión trispecíficas indicadas (resultados mostrados de todos los animales de ensayo).

Las **figuras 14V y 14W** muestran que las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38_(VH1) × CD28_(sup) × CD3_(mid) y anti-CD38_(VH1) × CD28_(cvt) × CD3_(mid) indujeron la reducción de linfocitos T *in vivo* en sangre de primate no humano a dosis más altas (6 horas después de la dosis).

Las **figuras 14X y 14Y** muestran que las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38_(HHY1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid) y anti-CD38_(HHY1370) × CD28_(cvt) × CD3_(mid) indujeron la reducción de linfocitos T *in vivo* en sangre de primate no humano a dosis más altas (6 horas después de la dosis).

Las **figuras 14Z y 14AA** muestran la cantidad de linfocitos T en sangre en primates no humanos a lo largo del tiempo después de la administración de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38_(VH1) × CD28_(sup) × CD3_(mid) o anti-CD38_(VH1) × CD28_(cvt) × CD3_(mid).

Las **figuras 14AB y 14AC** muestran la cantidad de linfocitos T en sangre en primates no humanos a lo largo del tiempo después de la administración de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38_(HHY1370) × CD28_(sup) × CD3_(mid) o anti-CD38_(HHY1370) × CD28_(cvt) × CD3_(mid).

Las **figuras 14AD y 14AE** muestran la cantidad de linfocitos T CD4⁺ con proteína de unión trispecífica unida después de la administración de dosis de 100 µg/kg en primates no humanos.

Las **figuras 14AF y 14AG** muestran la cantidad de linfocitos T CD8⁺ con proteína de unión trispecífica unida después de la administración de dosis de 100 µg/kg en primates no humanos.

Las **figuras 15A-15C** muestran la unión o ausencia de la misma de diversas variantes de Fc a los receptores de Fc humanos FcγR I (**figura 15A**), FcγR IIa (**figura 15B**) y FcγR IIIb/c (**figura 15C**). Las variantes ensayadas fueron IgG1 humana, IgG4 humana e IgG4 humana con mutaciones FALA.

La **figura 16** muestra la unión de IgG4 humana, con o sin mutaciones FALA, a FcRn.

La **figura 17** resume los parámetros PK de las proteínas de unión trispecíficas indicadas (IgG4 CD38_{VH1} × CD28_{sup} × CD3_{mid}, IgG4 FALA CD38_{VH1} × CD28_{sup} × CD3_{mid}, IgG1 LALA P329A CD38_{VH1} × CD28_{sup} × CD3_{mid} e IgG4 FALA CD38_{HHY1370} × CD28_{sup} × CD3_{mid}) en ratones NSG.

Las **figuras 18A-18C** muestran la liberación (no específica) mediada por interacción de Fc/FcR de IFN-γ (**figura 18A**), IL-2 (**figura 18B**) o TNF-α (**figura 18C**) por PBMC humanos incubados con proteínas de unión trispecíficas que tienen regiones Fc naturales o variantes FALA.

La **figura 18D** muestra la activación *in vitro* de PBMC humanos por proteínas de unión trispecíficas CD38_{VH1} × CD28_{sup} × CD3_{mid} y CD38_{HHY1370} × CD28_{sup} × CD3_{mid}, así como variantes IgG1 e IgG4 de Fc de las mismas.

Las **figuras 19A y 19B** muestran que la inducción de Bcl-xL en linfocitos T CD4⁺ (**figura 19A**) o CD8⁺ (**figura 19B**) por la proteína de unión trispecífica CD38_{VH1} × CD28_{sup} × CD3_{mid} requiere dominios de unión a antígeno CD3 y CD28. Gráfico de barras = media y d.t. de 3 donadores de PBMC. *p = ≤0,009.

Las **figuras 19C y 19D** muestran que $CD38_{VH1} \times CD28 \times CD3$ con variante IgG4 FALA de Fc regula por aumento Bcl-XL en linfocitos T $CD4+$ (**figura 19C**) o $CD8+$ (**figura 19D**) más que un anticuerpo biespecífico de referencia. Gráfico de barras = media y d.t. de 3 donadores de PBMC. * $p = \leq 0,045$

5 La **figura 19E** muestra que la activación de linfocitos T por proteínas de unión trispecíficas anti- $CD38 \times anti-CD28 \times anti-CD3$, como se ensaya por la expresión de IL-2 en una línea indicadora de linfocitos T Jurkat, depende del dominio de unión a antígeno anti- $CD3$.

10 La **figura 19F** muestra la liberación de citocinas TNF, IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-10 por proteínas de unión trispecíficas $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$, en comparación con proteínas de unión con las mutadas anti- $CD28$, anti- $CD38$ o anti- $CD28$, anti- $CD38$ y anti- $CD3$, así como la referencia.

15 La **figura 19G** muestra la proliferación de linfocitos T activados por proteína de unión trispecífica anti- $CD38 \times anti-CD28 \times anti-CD3$ con variante IgG4 FALA de Fc, anticuerpo biespecífico anti- $CD38 \times anti-CD3$ de referencia o control de isotipo (proteína de unión trispecífica con variante IgG4 FALA de Fc que tiene dominios de unión mutados).

20 La **figura 20** muestra la proliferación de linfocitos T activados por proteínas de unión trispecíficas anti- $CD38 \times anti-CD28 \times anti-CD3$ con variante IgG4 FALA de Fc, proteínas de unión trispecíficas anti- $CD38 \times anti-CD28 \times anti-CD3$ con variante IgG4 FALA de Fc y una mutación en el dominio de unión a antígeno $CD38$, $CD28$ o $CD3$, o control de isotipo (proteína de unión trispecífica con variante IgG4 FALA de Fc que tiene tres dominios de unión mutados).

25 La **figura 21** muestra la actividad antitumoral *in vivo* de la proteína de unión trispecífica IgG4 FALA $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ administrada a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG humanizados con PBMC.

La **figura 22** muestra la actividad antitumoral *in vivo* de la proteína de unión trispecífica IgG4 FALA $CD38_{HHY1370} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ administrada a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG humanizados con PBMC.

30 Las **figuras 23A y 23B** muestran una potente actividad de destrucción tumoral *in vitro* de células NCI-929-Luc con proteínas de unión trispecíficas $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ y $CD38_{HHY1370} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$, y anticuerpo biespecífico anti- $CD38 \times anti-CD3$ de referencia usando los PBMC humanos usados en el estudio *in vivo*. Se usaron PBMC humanos de dos ratones NSG humanizados donadores después de 24 h de incubación con una relación de efector:PBMC de 10:1.

35 La **figura 23C** muestra una actividad antitumoral *in vivo* superior de las proteínas de unión trispecíficas $CD38_{VH1} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ y $CD38_{HHY1370} \times CD28_{sup} \times CD3_{mid}$, en comparación con el anticuerpo biespecífico anti- $CD38 \times anti-CD3$ de referencia, administradas a las dosis indicadas en un modelo de tumor diseminado NCI-H929-Luc en ratones NSG humanizados con PBMC. Las proteínas de unión se administraron por inyección intraperitoneal (IP) semanal a 30 $\mu\text{g/kg}$.

40 La **figura 24A** muestra los resultados de un ensayo indicador de luciferasa usando células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ (Promega) después de estimulación por $CD38_{VH1}/CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ y sus mutantes KO de un solo sitio de unión y KO triple a concentración 10 nM.

45 La **figura 24B** muestra la optimización del anticuerpo CODV-Fab anti- $CD3 \times CD28$. La configuración óptima de $\alpha-CD3$ y $\alpha-CD28$ en posiciones alternativas del Fab biespecífico de CODV se evaluó por ensayos de liberación de citocinas usando PBMC humanos *in vitro*. Se identificó $CD28$ distal \times $CD3$ proximal como colocación óptima en función de la secreción de IFN- γ e IL-2 en el sobrenadante después de 24 horas.

50 La **figura 25** muestra que la regulación por aumento del miembro Bcl-xL de la familia de Bcl-2 en linfocitos T primarios inducida por $CD38_{VH1}/CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ es dependiente de $CD28$.

55 La **figura 26** muestra que anti- $CD28$ en el Ab trispecífico proporcionaba señalización secundaria esencial para apoyar la proliferación primaria de linfocitos T *in vitro*.

60 La **figura 27** muestra la configuración del anticuerpo trispecífico, codificado por colores por anticuerpo precursor (izquierda). Los tonos oscuros (púrpura o verde) indican péptidos de la cadena pesada; los tonos claros indican péptidos de la cadena ligera. También se muestra un modelo de estructura del Ab trispecífico $CD38_{VH1}/CD28_{sup} \times CD3_{mid}$ basado en estructuras cristalinas de Fab $VH1$ anti- $CD38$ y Fab $CD28_{sup}/CD3_{mid}$ (derecha).

65 Las **figuras 28A y 28B** muestran que células de mieloma múltiple (MM) con alta (RPMI-8226; **figura 28A**) y baja (KMS-11; **figura 28B**) expresión en la superficie de $CD38$ se lisaron de manera eficaz por PBMC humanos (E:T = 10:1) incubados con diversas concentraciones del Ab trispecífico. La contribución a la actividad de destrucción por cada sitio de unión se demostró mediante mutaciones KO del sitio de unión, como se indica.

Las **figuras 29A-29C** muestran que el mutante KO anti-CD28^{sup} del Ab triespecífico presentó una actividad antitumoral notablemente reducida contra células MM CD38^{high}, CD38^{mid} y CD38^{low} *in vitro*. Se muestran ensayos que usan células RPMI-8226 (**figura 29A**), U266 (**figura 29B**) o KMS-11 (**figura 29C**).

La **figura 30** muestra que la reducción de la carga tumoral en los grupos de tratamiento con anticuerpo triespecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}×CD3^{mid}_FALA fue dependiente de la dosis y estadísticamente diferente en un modelo de línea celular de mieloma múltiple humano diseminado usando un ratón NSG reconstituido con linfocitos T primarios humanos amplificados *in vitro*.

Las **figuras 31A y 31B** muestran análisis de microscopia vital de la citólisis de células de mieloma mediante el Ab triespecífico CD38 *in vitro* en presencia de linfocitos T humanos primarios. La fotografía a intervalos regulares de tiempo de imágenes microscópicas se realizó utilizando un control negativo (triespecífico KO triple; **figura 31A**) o el Ab triespecífico CD38/CD28×CD3 (**figura 31B**) usando PBMC humanos incubados con la línea celular de mieloma RPMI-8226 marcada con tinte rojo oscuro CellTracker™. Las imágenes presentadas se recogieron después de 24 horas de incubación. Barra de escala: 50 µm.

La **figura 32** muestra mutaciones alternativas en la región Fc de IgG4 preparadas para análisis en ensayos de unión al receptor de Fc. Se muestran SEQ ID NO: 111-116 (de la parte superior a la parte inferior, respectivamente).

La **figura 33** muestra los resultados de ensayos SPR para medir la afinidad de las variantes IgG4 de Fc especificadas por los receptores de Fc humanos indicados.

La **figura 34** muestra que una proteína de unión triespecífica a CD38 con unión mínima a FcR redujo la liberación no específica de citocinas por PBMC humanos *in vitro*. Se analizaron diferentes mutaciones inactivadoras de FcR (como se indica) para determinar sus efectos proinflamatorios en el isotipo de IgG4 humana. Se incubaron PBMC humanos en medios (no estimulados) o en presencia de células de mieloma, RPMI-8226 (estimulados), y las barras indican niveles de IFN-γ en el sobrenadante medidos por ELISA.

La **figura 35** muestra que una proteína de unión triespecífica a CD38 con unión mínima a FcR lisaba células de mieloma múltiple humano con diferentes niveles de expresión de CD38. La citólisis de las células de mieloma con IgG4 o las mutaciones de Fc indicadas se evaluó *in vitro* utilizando PBMC humanos con las dianas de tumor indicadas.

La **figura 36** muestra una comparación de la actividad citolítica *in vitro* del Ab anti-CD38/CD28/CD3 triespecífico y el anticuerpo anti-CD38 daratumumab medida usando PBMC humanos como células efectoras contra líneas celulares RPMI-8226, U266 y KMS-11 (E:T = 10:1).

Las **figuras 37A-37D** muestran la caracterización de la expansión *in vitro* del subconjunto de linfocitos T en respuesta a CD38/CD3×CD28. La evaluación de la expansión del subconjunto de linfocitos T se realizó recubriendo pocillos con 350 ng/pocillo del Ab triespecífico de CD38 en ausencia de citocinas exógenas. Las poblaciones de linfocitos T se midieron en los puntos temporales indicados. El Ab triespecífico mutante triple se usó como control negativo. Se usó citometría de flujo para determinar linfocitos T CD4 de memoria centrales y efectoras (**figura 37A**), linfocitos T auxiliares (**figura 37B**), linfocitos T CD8 de memoria centrales y efectoras (**figura 37C**) y células CD8 específicas de pp65 de CMV (**figura 37D**) como se describe en el ejemplo 12. El análisis de células efectoras pp65 específicas de CMV se realizó mediante tinción con pentámero de PBMC de donadores HLA-A2 CMV+ tratados con el triespecífico de CD38 o el control triple negativo.

La **figura 38** muestra la contribución de la expresión de CD28 en las células diana a la susceptibilidad a la citólisis por CD38/CD3×CD28. CD28 se inactivó en células KMS-11 usando la dirección génica CRISPR/Cas 9 y se usó como dianas citolíticas *in vitro*. En comparación con KMS-11 original, la expresión de CD38 se conservó mientras que CD28 se eliminó, como se demuestra por citometría de flujo (panel superior, KMS-11 frente a KMS-11 (CD28KO)). La citólisis de las células CD28 KO se examinó con el triespecífico WT o CD28 nulo (panel inferior; triespecífico frente a triespecífico (CD28KO)).

La **figura 39** muestra la actividad citolítica del Ab mutante FALA triespecífico CD38/CD28×CD3 contra las líneas CD38⁺CD28⁻ indicadas, que incluyen leucemia mielocítica aguda (AML (KG-1)), un linfoma de linfocitos B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL (KOPN8)) y linfoma linfocítico crónico (CLL(Z-138)).

La **figura 40** muestra que la activación *in vitro* de PBMC humanos por superagonista de α-CD28 requiere bivalencia del anticuerpo.

Descripción detallada

La divulgación proporciona una proteína de unión que comprende al menos un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38.

I. Definiciones generales

Como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, salvo que se indique de otro modo, tienen los siguientes significados. Salvo que se requiera de otro modo por el contexto, términos en singular deben incluir pluralidades y términos en plural deben incluir el singular. Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen los referentes en plural salvo que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la presente divulgación descritos en este documento incluyen aspectos y realizaciones "que comprenden", "que consisten en" y "que consisten esencialmente en".

El término "polinucleótido", como se usa en este documento, se refiere a polímeros de ácido nucleico monocatenarios o bicatenarios de al menos 10 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido puede ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Dichas modificaciones incluyen modificaciones de bases, tales como bromuridina, modificaciones de ribosa, tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de enlaces internucleotídicos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato y fosforoamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que: (1) no se asocia a todo o una parte de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) se une a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Un "polipéptido aislado" es uno que: (1) está libre de al menos algunos otros polipéptidos con los que se encontraría normalmente, (2) está esencialmente libre de otros polipéptidos de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente un 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no está asociado (por interacción covalente o no covalente) con partes de un polipéptido con las que el "polipéptido aislado" está asociado en la naturaleza, (6) está asociado de forma funcional (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociado en la naturaleza, o (7) no se produce en la naturaleza. Dicho polipéptido aislado puede estar codificado por ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN, de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de polipéptidos u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso (terapéutico, diagnóstico, profiláctico, de investigación o de otro modo).

Los anticuerpos de origen natural comprenden típicamente un tetrámero. Cada uno de dicho tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" de longitud completa (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las expresiones "cadena pesada" y "cadena ligera", como se usan en este documento, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tiene secuencia del dominio variable suficiente para conferir especificidad por un antígeno diana. La parte aminoterminal de cada cadena ligera y pesada incluye normalmente un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento de antígeno. La parte carboxiterminal de cada cadena define típicamente un dominio constante responsable de la función efectora. Por tanto, en un anticuerpo de origen natural, un polipéptido de inmunoglobulina de la cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}), en donde el dominio V_H está en el extremo amínico del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxílico, y un polipéptido de inmunoglobulina de la cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), en donde el dominio V_L está en el extremo amínico del polipéptido y el dominio C_L está en el extremo carboxílico.

Las cadenas ligeras humanas se clasifican típicamente como cadenas ligeras kappa y lambda, y las cadenas pesadas humanas se clasifican típicamente como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene varias subclases, incluyendo, aunque sin limitación, IgM1 e IgM2. IgA esta igualmente subdividida en subclases que incluyen, aunque sin limitación, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes se unen normalmente por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 más aminoácidos. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2.^a ed., 1989). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente un sitio de unión a antígeno. Los dominios variables de anticuerpos que origen natural presentan típicamente la misma estructura general de regiones flanqueantes (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas típicamente por las regiones flanqueantes, lo que puede posibilitar la unión a un epítipo específico. Del extremo amínico al extremo carboxílico, los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

La expresión "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que se producen en una única región variable que puede unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de forma diferente de acuerdo con sistemas diferentes. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites precisos de residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-17; Chothia *et al.*, 1989, Nature 342: 877-83) descubrieron que determinadas subpartes dentro de las CDR de Kabat adoptaban conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad al nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subpartes se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde "L" y "H" indican las regiones de la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que solapan con las CDR de Kabat. Otros límites que definen las CDR que solapan con las CDR de Kabat se han descrito por Padlan, 1995, FASEB J. 9: 133-39; MacCallum, 1996, J. Mol. Biol. 262(5): 732-45; y Lefranc, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77. Todavía otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de este documento, pero, no obstante, solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden estar acortadas o alargadas en vista de la predicción o hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR completas no afectan significativamente a la unión al antígeno. Los métodos usados en este documento pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque determinadas realizaciones usan CDR definidas por Kabat o Chothia. La identificación de CDR previstas usando la secuencia de aminoácidos es bien conocida en el campo, tal como en Martin, A.C. "Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains", en Antibody Engineering, vol. 2. Kontermann R., Dübel S., eds. Springer-Verlag, Berlín, pág. 33-51 (2010). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera también puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR por otros métodos convencionales, por ejemplo, por comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de la cadena pesada y ligera para determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Las secuencias numeradas pueden alinearse a simple vista o empleando un programa de alineación, tal como uno del paquete de programas CLUSTAL, como se describe en Thompson, 1994, Nucleic Acids Res. 22: 4673-80. Se usan convencionalmente modelos moleculares para delinear correctamente las regiones flanqueantes y CDR y corregir de ese modo las asignaciones basadas en secuencia.

En algunas realizaciones, la definición de CDR/FR en una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina debe determinarse en función de la definición IMGT (Lefranc *et al.* Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

El término "Fc", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que no se une a antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región de bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas. Las moléculas de Fc están compuestas por polipéptidos monoméricos que se pueden unir en formas díméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas Fc naturales varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA e IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA1, IgA2 e IgG4). Un ejemplo de un Fc es un dímero unido por disulfuro resultante de digestión con papaína de una IgG. La expresión "Fc natural", como se usa en este documento, es genérico para las formas monoméricas, díméricas y multiméricas.

Un fragmento F(ab) típicamente incluye una cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de una cadena pesada, en donde la parte de cadena pesada V_H-C_{H1} del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de la cadena pesada. Como se usa en este documento, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un conector de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un conector de aminoácidos y un dominio C_{H1}.

Un fragmento F(ab') típicamente incluye una cadena ligera y una parte de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C_{H1} y C_{H2}), de manera que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

La expresión "proteína de unión", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que no es de origen natural (o es recombinante o está manipulada) que se une específicamente a al menos un antígeno diana, por ejemplo, un polipéptido CD38 de la presente divulgación.

Una molécula "recombinante" es una que se ha preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes.

Una realización de la divulgación proporciona proteínas de unión que tienen especificidad biológica e inmunológica por entre uno y tres antígenos diana. Otra realización de la divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que forman dichas proteínas de unión. Otra realización de la divulgación proporciona vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cadenas polipeptídicas que forman dichas proteínas de unión. Otra realización más de la divulgación proporciona células hospedadoras que expresan dichas proteínas de

unión (es decir, que comprenden moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican cadenas polipeptídicas que forman dichas proteínas de unión).

La expresión "capacidad de intercambio", como se usa en este documento, se refiere a la intercambiabilidad de dominios variables dentro del formato de proteína de unión y con retención de plegamiento y afinidad de unión final. "Capacidad de intercambio completo" se refiere a la capacidad de intercambiar el orden de ambos dominios V_{H1} y V_{H2} y, por lo tanto, el orden de los dominios V_{L1} y V_{L2} , en la cadena polipeptídica de fórmula I o la cadena polipeptídica de fórmula II (es decir, para invertir el orden), mientras se mantiene la funcionalidad completa de la proteína de unión como se evidencia por la retención de la afinidad de unión. Además, debe observarse que las denominaciones V_H y V_L se refieren solo a la localización del dominio en una cadena de proteína particular en el formato final. Por ejemplo, V_{H1} y V_{H2} podrían derivar de dominios V_{L1} y V_{L2} en anticuerpos precursores y colocados en las posiciones V_{H1} y V_{H2} en la proteína de unión. Asimismo, V_{L1} y V_{L2} podrían derivar de dominios V_{H1} y V_{H2} en anticuerpos precursores y colocados en las posiciones V_{H1} y V_{H2} en la proteína de unión. Por tanto, las denominaciones V_H y V_L se refieren a la presente localización y no a la localización original en un anticuerpo precursor. Los dominios V_H y V_L son, por lo tanto, "intercambiables".

El término "antígeno" o "antígeno diana" o "diana antigénica", como se usa en este documento, se refiere a una molécula o una parte de una molécula que puede unirse por una proteína de unión, y adicionalmente puede usarse en un animal para producir anticuerpos que puedan unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos. Con respecto a cada antígeno diana reconocido por una proteína de unión, la proteína de unión puede competir con un anticuerpo intacto que reconoce el antígeno diana.

"CD38" es el polipéptido del grupo de diferenciación 38 y es una glucoproteína encontrada en la superficie de muchos inmunocitos. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une al dominio extracelular de uno o más polipéptidos CD38. Las secuencias polipeptídicas del dominio extracelular de CD38 ejemplares incluyen, aunque sin limitación, el dominio extracelular de CD38 humano (por ejemplo, representado por SEQ ID NO: 1) y el dominio extracelular de CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, representado por SEQ ID NO: 30).

La expresión "acoplador de linfocitos T" se refiere a proteínas de unión dirigidas al sistema inmunitario de un hospedador, más específicamente a la actividad citotóxica de linfocitos T, así como dirigidas a una proteína diana tumoral.

La expresión "proteína de unión monoespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a una diana antigénica.

La expresión "proteína de unión monovalente" se refiere a una proteína de unión que tiene un sitio de unión a antígeno.

La expresión "proteína de unión biespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a dos dianas antigénicas diferentes. En algunas realizaciones, una proteína de unión biespecífica se une a dos antígenos diferentes. En algunas realizaciones, una proteína de unión biespecífica se une a dos epítopos diferentes en el mismo antígeno.

La expresión "proteína de unión bivalente" se refiere a una proteína de unión que tiene dos sitios de unión.

La expresión "proteína de unión trispecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a tres dianas antigénicas diferentes. En algunas realizaciones, una proteína de unión trispecífica se une a tres antígenos diferentes. En algunas realizaciones, una proteína de unión trispecífica se une a uno, dos o tres epítopos diferentes en el mismo antígeno.

La expresión "proteína de unión trivalente" se refiere a una proteína de unión que tiene tres sitios de unión. En realizaciones particulares, la proteína de unión trivalente puede unirse a una diana antigénica. En otras realizaciones, la proteína de unión trivalente puede unirse a dos dianas antigénicas. En otras realizaciones, la proteína de unión trivalente puede unirse a tres dianas antigénicas.

Una proteína de unión "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para la proteína de unión, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, la proteína de unión se purificará: (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y mucho más preferiblemente más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos aminoterminal o interna por uso de un secuenciador de cubeta giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Las proteínas de unión aisladas incluyen la proteína de unión *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de la proteína de unión no estará presente.

Las expresiones "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado", como se usan este documento, se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición). En algunas realizaciones, una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie comprende al menos aproximadamente un 50 % (en términos molares) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones más, la especie se purifica hasta homogeneidad esencial (no se pueden detectar especies contaminantes en la composición por métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferentemente un determinante polipeptídico, que puede unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. En determinadas realizaciones, los determinantes epitópicos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales glucídicas, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une por un anticuerpo o proteína de unión. En determinadas realizaciones, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En algunas realizaciones, se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-8}$ M, más preferiblemente cuando la constante de disociación en equilibrio es $\leq 10^{-9}$ M y mucho más preferiblemente cuando la constante de disociación es $\leq 10^{-10}$ M.

La constante de disociación (K_D) de una proteína de unión puede determinarse, por ejemplo, por resonancia de plasmones superficiales. En general, el análisis por resonancia de plasmones superficiales mide interacciones de unión instantáneas entre ligando (un antígeno diana en una matriz de biosensor) y analito (una proteína de unión en solución) por resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmones superficiales también puede realizarse inmovilizando el analito (proteína de unión en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (antígeno diana). El término " K_D ", como se usa en este documento, se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión particular y un antígeno diana.

La expresión "se une a", como se usa en este documento en referencia a una proteína de unión, se refiere a la capacidad de una proteína de unión o un fragmento de unión a antígeno de la misma de unirse a un antígeno que contiene un epítipo con una K_D de al menos aproximadamente 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 o más, y/o de unirse a un epítipo con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a dos o más antígenos, por ejemplo, un polipéptido CD38 humano y de macaco cangrejero.

En algunas realizaciones, un dominio de unión a antígeno y/o proteína de unión de la presente divulgación "reacciona de forma cruzada" con polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero, por ejemplo, dominios extracelulares de CD38, tales como SEQ ID NO: 1 (isoforma A de CD38 humano), SEQ ID NO: 105 (isoforma E de CD38 humano) y SEQ ID NO: 30 (CD38 de macaco cangrejero). La unión de una proteína de unión al antígeno 1 (Ag1) tiene "reactividad cruzada" con el antígeno 2 (Ag2) cuando las CE_{50} están en un intervalo similar para ambos antígenos. En la presente solicitud, la unión de una proteína de unión a Ag1 tiene reactividad cruzada con Ag2 cuando la relación de afinidad de Ag2 a la afinidad de Ag1 es igual o menor de 10 (por ejemplo, 5, 2, 1 o 0,5), midiéndose las afinidades con el mismo método para ambos antígenos.

La unión de una proteína de unión a Ag1 es "no reactiva de forma cruzada significativamente" a Ag2 cuando las afinidades son muy diferentes para los dos antígenos. La afinidad por Ag2 puede no ser medible si la respuesta de unión es demasiado baja. En la presente solicitud, la unión de una proteína de unión a Ag1 no es reactiva de forma cruzada significativamente con Ag2, cuando la respuesta de unión de la proteína de unión a Ag2 es menor de un 5 % de la respuesta de unión de la misma proteína de unión a Ag1 en el mismo entorno experimental y en la misma concentración de anticuerpo. En la práctica, la concentración de la proteína de unión usada puede ser la CE_{50} o la concentración necesaria para alcanzar la meseta de saturación obtenida con Ag1.

El término "conector", como se usa en este documento, se refiere a uno o más residuos aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar movilidad suficiente para que los dominios de las cadenas ligeras y pesadas se plieguen en las inmunoglobulinas de región variable doble cruzada. Un conector se inserta en la transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, a nivel de secuencia. La transición entre dominios puede identificarse debido a que se entiende bien el tamaño aproximado de los dominios de inmunoglobulina. La localización precisa de una transición de dominio puede determinarse localizando tramos peptídicos que no forman elementos estructurales secundarios, tales como láminas beta o hélices alfa, como se demuestra por datos experimentales o como puede suponerse por técnicas de modelado o predicción de estructuras secundarias. Los conectores descritos en este documento se denominan L_1 , que se localiza en la cadena ligera entre el extremo C del dominio V_{L2} y el extremo N del dominio V_{L1} ; y L_2 , que se localiza en la cadena ligera entre el extremo C del dominio V_{L1} y el extremo N del dominio C_L . Los conectores de cadena pesada se conocen como L_3 , que se

localiza entre el extremo C del dominio V_{H1} y el extremo N del dominio V_{H2} ; y L_4 , que se localiza entre el extremo C del dominio V_{H2} y el extremo N del dominio C_{H1} .

El término "vector", como se usa en este documento, se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) que se usa para transferir información codificante a una célula hospedadora. El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN bicatenario circular en la que pueden insertarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden insertarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de la célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos de forma funcional. Dichos vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente en este documento, ya que un plásmido es la forma más habitualmente usada de vector. Sin embargo, la divulgación pretende incluir otras de estas formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o "célula hospedadora"), como se usa en este documento, se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Una célula hospedadora recombinante o célula hospedadora pretende referirse no solo a la célula en cuestión particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Como pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede no ser, de hecho, idéntica a la célula progenitora, pero dichas células aún se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en este documento. Puede usarse una amplia variedad de sistemas de expresión de células hospedadoras para expresar las proteínas de unión, incluyendo sistemas de expresión bacterianos, de levadura, baculovíricos y de mamífero (así como sistemas de expresión por presentación en fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar una proteína de unión de forma recombinante, una célula hospedadora se transforma o transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, de modo que las cadenas polipeptídicas se expresan en la célula hospedadora y, preferiblemente, se secretan en el medio en que las células hospedadoras se cultivan, de cuyo medio puede recuperarse la proteína de unión.

El término "transformación", como se usa en este documento, se refiere a un cambio en las características genética de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para que contenga un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente de su estado natural. Tras la transformación, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula por integración física en un cromosoma de la célula, o puede mantenerse transitoriamente como un elemento episómico sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado establemente cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término "transfección", como se usa en este documento, se refiere a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido en el interior de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica varias técnicas de transfección. Dichas técnicas pueden usarse para introducir una o más moléculas de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

La expresión "de origen natural", como se usa en este documento y se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto puede encontrarse en la naturaleza y no se ha manipulado por el ser humano. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano es de origen natural. Asimismo, "de origen no natural", como se usa en este documento, se refiere a un objeto que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o se ha sintetizado por el ser humano.

Como se usa en este documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; aminoácidos no naturales y análogos, tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alkil-aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales, también pueden ser componentes adecuados para las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en este documento, la dirección a mano izquierda es la dirección del extremo amínico y la dirección a mano derecha es la dirección del extremo carboxílico, de acuerdo con el uso y las convenciones habituales.

Los residuos de origen natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Tyr, Pro;
- (2) hidrófilos polares: Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr ;

- (3) alifáticos: Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Pro;
- (4) hidrófobos alifáticos: Ala, Ile, Leu, Val, Pro;
- (5) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (6) ácidos: Asp, Glu;
- (7) básicos: His, Lys, Arg;
- (8) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y
- (10) hidrófobos aromáticos: Phe, Trp, Tyr.

10 Sustituciones aminoacídicas conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con otro miembro de la misma clase. Sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

15 Un experto será capaz de determinar variantes adecuadas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión usando técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un experto en la materia puede identificar zonas adecuadas de una cadena polipeptídica que pueden cambiarse sin destruir la actividad al dirigirse a regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. Como alternativa, un experto en la materia puede identificar residuos y partes de las moléculas que están conservadas entre polipéptidos similares. Además, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura se pueden someter a sustituciones aminoacídicas conservativas sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

El término "paciente", como se usa en este documento, incluye sujetos humanos y animales (por ejemplo, mamíferos, tales como perros, cerdos, caballos, gatos, vacas, etc.).

25 Los términos "tratamiento" o "tratar", como se usan en este documento, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como al profiláctico o medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que tiene un trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se tiene que prevenir el trastorno. En realizaciones particulares, las proteínas de unión pueden usarse para tratar a seres humanos con cáncer, o seres humanos susceptibles al cáncer, o para mejorar el cáncer en un sujeto humano. Las proteínas de unión también pueden usarse para prevenir el cáncer en un paciente humano. En realizaciones particulares, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, linfoma, cáncer de mama tal como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, linfoma de linfocitos B centrales germinales o leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B.

35 Las expresiones "composición farmacéutica" o "composición terapéutica", como se usan en este documento, se refieren a un compuesto o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

40 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable", como se usa este documento, se refiere a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o potenciar la administración de una proteína de unión.

45 Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se usan en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de unión, se refieren a una cantidad o dosis suficiente para producir un resultado terapéutico deseado. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de una proteína de unión suficiente para inhibir, durante un cierto periodo de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados a la afección que se está tratando. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la proteína de unión específica que se esté usando, y también depende de una variedad de factores y condiciones relacionadas con el paciente que se esté tratando y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si la proteína de unión se va a administrar *in vivo*, factores tales como la edad, el peso y la salud del paciente, así como las curvas de respuesta a la dosis y los datos de toxicidad obtenidos en trabajo preclínico en animales, estarían entre los factores considerados. La determinación de una cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica dada está perfectamente dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

55 Una realización de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión.

II. Proteínas de unión anti-CD38

60 Determinados aspectos de la presente divulgación se refieren a proteínas de unión que comprenden un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38 (por ejemplo, polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero). En algunas realizaciones, las proteínas de unión son mono-específicas y/o monovalentes, o bio-específicas y/o bivalentes.

65 En este documento se describe una diversidad de rasgos característicos de proteínas de unión mono-específicas o bio-específicas ejemplares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma reacciona de forma cruzada con CD38 humano (por ejemplo, un polipéptido CD38 humano de

isoforma A y/o isoforma E) y CD38 de macaco cangrejero. En algunas realizaciones, una proteína de unión induce la apoptosis de una célula CD38+. En algunas realizaciones, una proteína de unión recluta un linfocito T hacia una célula CD38+ y opcionalmente activa el linfocito T (por ejemplo, a través de la estimulación y/o coestimulación de TCR).

5 En algunas realizaciones, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESDSYGNGF QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQG (SEQ ID NO: 132), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En otras realizaciones, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, las proteínas de unión comprenden un sitio de unión a antígeno que comprende: un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia, del extremo N al extremo C, FR1-CDR-H1-FR2-CDR-H2-FR3-CDR-H3-FR4; donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 87) o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); donde FR2 comprende la secuencia MHVVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHVVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 94); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 96).

Tabla G. Secuencias de CDR de proteínas de unión anti-CD38.

Ab	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_L1	CDR_L2	CDR_L3
mAb1 (no forma parte de la presente invención)	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)

Ab	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_L1	CDR_L2	CDR_L3
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 (no forma parte de la presente invención)	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNNGT (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 (no forma parte de la presente invención)	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNNGT (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 (no forma parte de la presente invención)	GYTFTSFN (SEQ ID NO:31)	IYPGNNGT (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 (no forma parte de la presente invención)	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)

Tabla H. Secuencias del dominio variable de anti-CD38 (mAb1-7) y otras proteínas de unión.

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
mAb1 (no forma parte de la presente invención)	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCK ASGYTFTSFNMHWVKETPGQGLE WIGYIYPGNNGGTNYNQKFKGKAT LTADTSSTAYMQISSLTSEDSAVY FCARTGGLRRAYFTYWGQGLTV TVSS (SEQ ID NO:5)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYGNGFMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESQVPA SGSGSRDFTLTIDPVEADDA TYYCQONKEDPWTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:6)
mAb2	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCK ASGYTFTSYAMHWVKEAPGQRL WIGYIYPGQGGTNYNQKFQGRAT LTADTSASTAYMELSSLRSEDTAV YFCARTGGLRRAYFTYWGQGL TVSS (SEQ ID NO:13)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR ASQSVSSYGQGMHWYQQK GQPPRLLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISP LEP EDFAVYYCQONKEDPWTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:14)
mAb3 (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCK ASGYTFTSFNMHWVKEAPGQRL WIGYIYPGNNGGTNYNQKFQGRAT LTADTSASTAYMELSSLRSEDTAV YFCARTGGLRRAYFTYWGQGL TVSS (SEQ ID NO:17)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR ASESVDSYGNGFMHWYQQK GQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISP LEP EDFAVYYCQONKEDPWTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:18)

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
mAb4 (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCK AS <u>GYTFTSF</u> NMHWVKEAPGQGLE WIGYI <u>YPGNGGT</u> NYNQKFQGRAT LTADTSASTAYMEISSLRSEDVAV YFC <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO:21)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR ASE <u>SVD</u> <u>SYGN</u> <u>GFM</u> HWYQQKP GQPPRLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISP LEP EDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO:18)
mAb5 (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCK AS <u>GYTFTSF</u> NMHWVKEAPGQGLE WIGYI <u>YPGNGGT</u> NYNQKFQGRAT LTADTSASTAYMEISSLRSEDVAV YFC <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO:23)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR ASE <u>SVD</u> <u>SYGN</u> <u>GFM</u> HWYQQKP GQPPRLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISP LEP EDFAVYYC <u>QONKEDPWT</u> FGG GTKLEIK (SEQ ID NO:18)
mAb6 (no forma parte de la presente invención)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA AS <u>GFTFSSY</u> GMHWVRQAPGKGLE WVAVI <u>WYDGSNK</u> YYADSVKGRF TISGDN SKNTLYLQMNSLR AEDTA VYYC <u>ARMERGA</u> <u>FDY</u> WGQGT LTVSS (SEQ ID NO:9)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC RAS <u>QGI</u> <u>RND</u> LGWYQQKPGKAP KLLIYA <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISGLQPEDSATYYC <u>L</u> <u>ODYIYPT</u> FGGQGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
mAb7 (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCK ASGYTFTDYWMQWVKQRPQGL EWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGKAT LTADKSSKTVMHLSSLASEDSAV YYCARGDYYGSNSLDYWGQGT SVTVSS (SEQ ID NO:47)	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITC KASQDVSTVVAWYQQKPGQSP RRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGA GTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQ QHYSPPYTFGGCTKLEIK (SEQ ID NO:48)
Anti-CD28 ^{sup} (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCK AS <u>GYTFTSY</u> YIHWVRQAPGQGLE WIGSI <u>YPGNVNT</u> NYAQKFQGRAT LTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC QAS <u>QNIY</u> <u>VWL</u> NWYQQKPGKA PKLLIY <u>KAS</u> NLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDIAITYYC <u>Q</u>
	YYC <u>TRSHYGLDWN</u> <u>FDY</u> WGKGT LTVSS (SEQ ID NO:49)	<u>Q</u> <u>GOTYP</u> <u>PT</u> FGGQGTKLEIK (SEQ ID NO:50)

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
Anti-CD28 _{ovn} (no forma parte de la presente invención)	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTV <u>SGFSLSDYG</u> VHWVRQPPGKGLEW LGVI <u>WAGGGT</u> NYNPSLKSRKTISK DTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYY <u>CARDKGYSYYSM</u> <u>MDY</u> WGQGTTV TVSS (SEQ ID NO:51)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITC RASE <u>ESVEYYVTSL</u> MQWYQQKP GQPPKLLIFA <u>ASN</u> VESGVPARFS SGSGGTDFTLTINPVEANDVAN YYC <u>QOSRKVPY</u> TFGQGTKLEI K (SEQ ID NO:52)
Anti-CD3 _{mid} (no forma parte de la presente invención)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA AS <u>GFTFTKAW</u> MHWVRQAPGKQL EWVAQ <u>IKDKSNSYAT</u> YYADSVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC <u>RGVYYALSP</u> <u>FDY</u> WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:53)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSS <u>QSLVHNNANTY</u> LSWYLQK PGQSPQSLIY <u>KVSN</u> RFSGVPDRF SGSGGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC <u>GOGTOYP</u> TFGSGTKVE IK (SEQ ID NO:54)
Anti-CD3 _{low} (no forma parte de la presente invención)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA AS <u>GFTFTKAW</u> MHWVRQAPGKGL EWVAQ <u>IKDKSNSYAT</u> YYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYC <u>RGVYYALSP</u> <u>FDY</u> WGQG TLVTVSS (SEQ ID NO:84)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC KSS <u>QSLVHNNGNTY</u> LSWYLQK PGQSPQLLIY <u>KVSN</u> RFSGVPDRF SGSGGTDFTLKISRVEAEDVG VYYC <u>GOGTOYP</u> TFGGGTKVE IK (SEQ ID NO:85)
Nota: Las secuencias de CDR están en negrita y subrayadas en las secuencias de aminoácidos anteriores.		

Tabla I. Secuencias de longitud completa de proteínas de unión.

<p>IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid Cadena pesada 1 de IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)</p>	<p>QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYIHWRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTVT VSSSQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLTVSSRTASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQ KSLSLSLG</p>	<p>SEQ ID NO: 60</p>
<p>Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)</p>	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVH NNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDI QMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQGQT YPYTFGQGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>	<p>SEQ ID NO: 61</p>

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG4(botón) FALA mAb2 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGGQTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG	SEQ ID NO: 62
Cadena ligera 2 de mAb2 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSY GQGFMHWYQQKPGQPPRLLIYGASSRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYCQ QNKEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	SEQ ID NO: 63 (no forma parte de la presente invención)
IgG1 LALA P329A MAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1 (ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid		SEQ ID NO: 64 (no

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTVT VSSSQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	forma parte de la presente invención)
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 61 (no forma parte de la presente invención)
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) LALA P329A mAb2 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PG	SEQ ID NO: 65
Cadena ligera 2 de mAb2 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 63

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1(ojal) NNSA CD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTA VYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVT VSSSQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 66
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 61

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) NNSA mAb2 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 67
Cadena ligera 2 de CD38VH1 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 63
IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 60
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 61

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG4(botón) FALA mAb6 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG	SEQ ID NO: 68
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRN DLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQDY IYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 69
IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1 (ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 64
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 61

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) LALA P329A mAb6 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKN YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVQLHQLDNLNGKEYKCKVSNK ALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 70
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 69
IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1(ojal) NNSA CD28supxCD3mid (por ejemplo, una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 66
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 61

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) NNSA mAb6 (por ejemplo, una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKN YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN NASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PG</p>	SEQ ID NO: 71
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 69

Anticuerpo monovalente mAb1		
Cadena pesada de mAb1	<p>QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKETPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISLTS EDSAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G</p>	SEQ ID NO: 7

Anticuerpo monovalente mAb1		
Cadena ligera de mAb1	<div>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YNGFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC</div>	SEQ ID NO: 8
Anticuerpo monovalente mAb2		
Cadena pesada de mAb2	<div>QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G</div>	SEQ ID NO: 15
Cadena ligera de mAb2	<div>DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSY GQGFMHWYQQKPGQPPRLLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFLTISPLEPEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC</div>	SEQ ID NO: 16

Anticuerpo monovalente mAb3		
Cadena pesada de mAb3	<p>QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTILVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G</p>	SEQ ID NO: 19
Cadena ligera de mAb3	<p>DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASEVDSY GNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC</p>	SEQ ID NO: 20
Anticuerpo monovalente mAb4		
Cadena pesada de mAb4	<p>QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTILVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP</p>	SEQ ID NO: 22

Anticuerpo monovalente mAb3		
	<p> SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G </p>	
Cadena ligera de mAb4	<p> DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASEVDSY GNGFMHWYQQKPGQPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLS TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC </p>	SEQ ID NO: 20
Anticuerpo monovalente mAb5		
Cadena pesada de mAb5	<p> QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G </p>	SEQ ID NO: 24

Anticuerpo monovalente mAb5		
Cadena ligera de mAb5	<p>DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSY GNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSS</p>	SEQ ID NO: 20
	<p>TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC</p>	
Anticuerpo monovalente mAb6		
Cadena pesada de mAb6	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKN YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELAGP DVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	SEQ ID NO: 11
Cadena ligera de mAb6	<p>AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRN DLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQD YIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTL TLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>	SEQ ID NO: 12

Anticuerpo monovalente mAb7		
Cadena pesada de mAb7	<p>QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFT DYWMQWYKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDT GYAQKFQGGKATLTADKSSKTVYMHLSSLA SEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWGQGTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK</p>	SEQ ID NO: 107
Cadena ligera de mAb7	<p>DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVST VVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDR FTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YSPPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>	SEQ ID NO: 106

Tabla J. Secuencias polinucleotídicas de longitud completa de proteínas de unión.

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		SEQ ID NO: 72
<p>Cadena pesada 1 de IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCGGTCCCCTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAAACCCTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCCTT GCAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAC TCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACAC CTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCC TGTAATCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCT ACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAA TCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCCTTG CCCAGCCCCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCT CCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA</p>	

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
	AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC AGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGT TCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGA AAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC CCGCGAGCCTCAAGTGTGTACCCTGCCCC CTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCT TCTACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATGG GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACT ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCT GACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAA GGCAACGTGTTTACGCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAG CCTGAGCGTGACACCTGGACAGCCTGCCA GCATCAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCT GGTGCACAACAACGCCAACACCTACCTG AGCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGA GCCCCCAGTCCCTGATCTACAAGGTGTCC AACAGATTACGCGGCGTGCCCGACAGATT CTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCA CCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAGCCGA GGACGTGGGCGTGTACTATTGTGGCCAGG GCACCCAGTACCCCTTCACCTTTGGCAGC GGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCCAGC CCAAGGCCGCCCCCGACATCCAGATGACC CAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAG GCCAGCCAGAACATCTACGTGTGGCTGAA CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCC CCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAA CCTGCACACCGGCGTGCCAGCAGATTTT CTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC CTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA CATTGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCC AGACCTACCCCTACACCTTTGGCCAGGGC	SEQ ID NO: 73

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
	<p> ACCAAGCTGGAAATCAAGACCAAGGGCC CCAGCCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCTGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCC AAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTG TACGCCTGCCAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGT </p>	
<p> Cadena pesada 2 de IgG4(botón) FALA mAb2 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención) </p>	<p> CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCA CCAACTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAACTGAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCCTTG CAGCAGAAGCACCCAGCGAATCTACAGCC GCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTT TCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACT CTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCCT GTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCAGCCTGGGACCAAGACCTA CACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAT CTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGC CCAGCCCCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCCTC CGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCCAAGG ACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA GGAAGATCCCGAGGTGCACTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC </p>	<p> SEQ ID NO: 74 </p>

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
	CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTC AACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCC CGCGAGCCTCAAGTGTATACCCTGCCCCC TTGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGTGGTGTCTCGTGAAAGGCTT CTACCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGG AGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCG ACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAG GCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
Cadena ligera 2 de mAb2 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAC CCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCA CCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCGT GTCCAGCTACGGCCAGGGCTTCATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCC CAGACTGCTGATCTATGGCGCCAGCAGCA GAGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTTTCT GGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACAATCAGCCCCCTGGAACCCGAGGAC TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAACAA AGAGGACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCT AGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAG CCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTTC TACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATTAC GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAG TGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	SEQ ID NO: 75
IgG1 LALA P329A MAb2xCD28supxCD3mid		

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		SEQ
<p>Cadena pesada 1 de IgG1 (ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGIGTACTACT GCACCCGGTCCCACTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAACCTTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTTCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG TCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAAGCCGCCG GAGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCTCCCCCA AAGCCCCAAGGACACCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA</p>	<p>ID NO: 76</p>

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
	<p>GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAG AGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCC CCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTGC ACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACCTACAAGACCAACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTC'TTCCTGG TGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGC</p>	
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 73
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) LALA P329A mAb2 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCCGCA CCAACCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAG CAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCC</p>	SEQ ID NO: 77

IgG4 FALA mAb2xCD28supxCD3mid		
	<p> GCCCTGGGCTGCCCTCGTGAAGGACTACTT TCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAATT CTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACC TTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCCCCTTGTCTGCCCCCGAAGCCGCCGG AGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGA GGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCC CATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCCCCGCAACCCCAGGTGTACA CACTGCCCCCATGCAGGGACGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGT GAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCG TGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTAC TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGCTCCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG C </p>	
<p> Cadena ligera 2 de mAb2 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención) </p>	Véase anteriormente.	<p> SEQ ID NO: 75 </p>

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		SEQ
<p>Cadena pesada 1 de IgG1(ojal) NNSA CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)</p>	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACCTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCTACATGGAACTGAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCGGTCCCCTACTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAACCTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACAC CTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG TCCCCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGG GAGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA</p>	<p>ID NO: 78</p>

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
	<p>GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAG AGGAACAGTACAACAATGCCTCCCCGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCC CCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTGC ACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCCTCTGG TGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGC</p>	
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 73
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) NNSA mAb2 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCCGCA CCAACCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG</p>	SEQ ID NO: 79

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
	<p> GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACAC CTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTATGTTGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAATGCCTCCCGTGTGGTC AGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAG AATCAAGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTAAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACTCAA AACTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT </p>	
Cadena ligera 2 de mAb2 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 75
IgG4 FALA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG4(ojal) FALA CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 72
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 73

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		SEQ ID NO: 80
Cadena pesada 2 de IgG4(botón) FALA mAb6 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGCCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCCATCG GTGTTCCCTCTGGCCCCCTTGCAGCAGAAG CACCAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCT GACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCG TGCTCCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTG AGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCA GCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAAC GTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGCGGGTGGGAATCTAAGTACGG CCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTG	

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
	AAGCTGCCGGCGGACCCCTCCGTGTTTCCTG TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCAGCCGGACCCCGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCC CGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCC TGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTC AAGTGTATACCCTGCCCCCTTGCCAGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGT GGTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGC GACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCAC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT TCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGT TCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC TCTGTCCCTGGGC	
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCA GCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCAT CCGGAACGACCTGGGCTGGTATCAGCAG AAGCCTGGCAAGGGCCCCAAGCTGCTGAT CTACGCCGCTAGCTCTCTGCAGTCCGGCG TGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC GGCACCGACTTCACCCTGACAATCTCTGG CCTGCAGCCCGAGGACAGCGCCACCTACT ACTGTCTGCAAGACTACATCTACTACCCC ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAA TCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCTGTGTC TGCTGAACAACCTCTACCCCCGCGAGGCC AAAGTGCAAGTGGGAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTG	SEQ ID NO: 81

IgG1 NNSA mAb2xCD28supxCD3mid		
	TACGCCTGCCGAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGT	

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1 (ojal) LALA P329A CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 76
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 73
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) LALA P329A mAb6 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCCCAGC GTGTTCCCTCTGGCCCCCTAGCAGCAAGAG CACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAATTCCTGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTG TGCTGCAGTCCAGCGGCTGTACAGCCTG	SEQ ID NO: 82

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
	AGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAAGCAGCTC TCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC TGCCCCCGAAGCCGCGGAGGCCCTTCCG TGTTCCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGTACAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGCCCTGGCCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGC GAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCATG CAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTA CCCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA GACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACG GCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACA GTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTC CCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 81
IgG1 NNSA mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 1 de IgG1(ojal) NNSA CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una segunda cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 78
Cadena ligera 1 de CD28supxCD3mid (por ejemplo, que codifica una primera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 73

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
Cadena pesada 2 de IgG1(botón) NNSA mAb6 (por ejemplo, que codifica una tercera cadena polipeptídica de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG	SEQ ID NO: 83

IgG1 LALA P329A mAb6xCD28supxCD3mid		
	TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA TGTTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAATGCCTCCCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGC CGGGATGAGCTGACCAAGAATCAAGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTAAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACTCAAAACTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGT	
Ligera 2 de mAb6 (por ejemplo, que codifica una cuarta cadena polipeptídica de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación) (no forma parte de la presente invención)	Véase anteriormente.	SEQ ID NO: 81

Polipéptidos CD38

5 En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero. Ensayos ejemplares para determinar si un sitio de unión a antígeno se une a un antígeno se describen en este documento y se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante ensayo ELISA, por ejemplo, como se describe más abajo. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante ensayo SPR, por ejemplo, como se describe más abajo. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante ensayo de citometría de flujo usando células que expresan un polipéptido CD38 en su superficie celular, por ejemplo, como se describe más abajo. Véanse, por ejemplo, los ejemplos 1, 3 y 4.

15 En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido purificado o fragmento del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 30 (por ejemplo, como se mide por ELISA o SPR). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 30 cuando se expresa en la superficie de una célula (por ejemplo, como se mide por citometría de flujo).

20 En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido CD38 de isoforma A (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido CD38 de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y que no comprende la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido CD38 de isoforma A (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y un polipéptido CD38 de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y que no comprende la secuencia de aminoácidos completa de SEQ ID NO: 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). Sin el deseo de limitarse teoría alguna, se cree que la unión a un polipéptido CD38 de isoforma E

puede ser ventajosa, por ejemplo, en la dirección de una proteína de unión de la presente divulgación a una célula o células que expresan un polipéptido CD38 de isoforma E.

Secuencia polipeptídica del dominio extracelular de la isoforma A de CD38 humano

5 RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCN
ITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDL
TWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSR
SKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRN
QFSCCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO:1)

10 Secuencia polipeptídica de la isoforma E de CD38 humano

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCN
ITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDL
TWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRHFWECGSP (SEQ ID
NO:105)

15 En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

Secuencia polipeptídica de CD38 de macaco cangrejero

RWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPC
NITEEDYQPLVKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLAD
DLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNG
SRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKR
20 NIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI (SEQ ID NO:30)

Proteínas de unión multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas) que se unen a polipéptidos CD38

25 En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación es una proteína de unión biespecífica que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a uno o más polipéptidos CD38 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un antígeno diana diferente. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación es una proteína de unión biespecífica que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a uno o más polipéptidos CD38 y un segundo sitio de unión a antígeno que se une a uno o más polipéptidos CD38.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido CD38 humano comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y/o el polipéptido CD38 de macaco cangrejero comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero y dos sitios de unión a antígeno que se unen cada uno a una proteína de superficie de linfocitos T (por ejemplo, un polipéptido CD28 humano y/o un polipéptido CD3 humano).

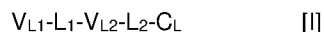
35 En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a una o más proteínas diana tumorales (por ejemplo, uno o más polipéptidos CD38) y una o más proteínas diana de linfocitos T. En algunas realizaciones, la proteína de unión puede unirse a una proteína diana tumoral (por ejemplo, uno o más polipéptidos CD38) y dos epítomos diferentes en una sola proteína diana de linfocitos T. En algunas realizaciones, la proteína de unión puede unirse a una proteína diana tumoral (por ejemplo, uno o más polipéptidos CD38) y dos proteínas diana de linfocitos T diferentes (por ejemplo, CD28 y CD3). En algunas realizaciones, la proteína de unión puede unirse a una proteína diana de linfocitos T y dos epítomos diferentes en una sola proteína diana tumoral (por ejemplo, uno o más polipéptidos CD38). En algunas realizaciones, la proteína de unión puede unirse a una proteína diana de linfocitos T y dos proteínas diana tumorales diferentes (por ejemplo, uno o más polipéptidos CD38 y otra proteína diana tumoral).
40 En algunas realizaciones, la una o más proteínas diana de linfocitos T son una o más de CD3 y CD28.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión se unen específicamente a uno o más polipéptidos CD38 y una o más proteínas diana en un linfocito T que incluye un complejo del receptor de linfocitos T. Estas proteínas de unión a acopladores de linfocitos T pueden reclutar linfocitos T transitoriamente hacia las células diana y, al mismo tiempo, activar la actividad citolítica de los linfocitos T. Ejemplos de proteínas diana en linfocitos T incluyen, aunque sin limitación, CD3 y CD28, entre otras. Ejemplos adicionales de dichas dianas antigénicas o proteínas diana se proporcionan más arriba.

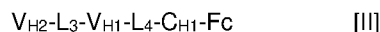
Formatos de proteína de unión biespecífica

En algunas realizaciones, la proteína de unión de la divulgación es una proteína de unión biespecífica y/o bivalente que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman cuatro sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (por ejemplo, dos) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes (por ejemplo, que tienen una estructura descrita en la publicación internacional n.º WO2012/135345). En algunas realizaciones, la proteína de unión es bivalente y/o biespecífica. En algunas realizaciones, la proteína de unión es tetravalente y/o tetraespecífica. En algunas realizaciones, la proteína de unión es tetravalente y/o biespecífica. En algunas realizaciones, al menos uno de los sitios de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (por ejemplo, el dominio extracelular de polipéptidos CD38 humanos y/o de macaco cangrejero).

En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende dos cadenas polipeptídicas que tienen una estructura representada por la fórmula:



y dos cadenas polipeptídicas que tienen una estructura representada por la fórmula:



en donde:

V_{L1} es un primer dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{L2} es un segundo dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{H1} es un primer dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

V_{H2} es un segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

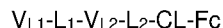
C_{H1} es el dominio constante de la cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina;

F_c comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y los dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} , C_{H3} de inmunoglobulina;

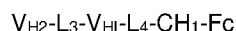
L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son conectores aminoácidos;

y en donde los polipéptidos de fórmula I y los polipéptidos de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada cruzado. En algunas realizaciones, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica. En algunas realizaciones, V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica.

En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende dos cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende



y una segunda cadena polipeptídica comprende



en donde:

V_{L1} es un primer dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{L2} es un segundo dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{H1} es un primer dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

V_{H2} es un segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C_{H1} es el dominio constante de la cadena pesada C_{H1} de inmunoglobulina;

C_{H2} es un dominio constante de la cadena pesada C_{H2} de inmunoglobulina;

C_{H3} es un dominio constante de la cadena pesada C_{H3} de inmunoglobulina;

F_c comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y los dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} , C_{H3} de inmunoglobulina; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son conectores aminoácidos;

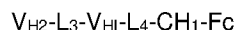
en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada cruzado. En algunas realizaciones, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H2} y V_{L2} forman

un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica. En algunas realizaciones, V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende tres cadenas polipeptídicas que forman dos sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena polipeptídica comprende



- 10 una segunda cadena polipeptídica comprende



- 15 una tercera cadena polipeptídica comprende una región Fc de anticuerpo

en donde:

V_{L1} es un primer dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{L2} es un segundo dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{H1} es un primer dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

- 20 V_{H2} es un segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

CH_1 es el dominio constante de la cadena pesada CH_1 de inmunoglobulina;

CH_2 es un dominio constante de la cadena pesada CH_2 de inmunoglobulina;

CH_3 es un dominio constante de la cadena pesada CH_3 de inmunoglobulina;

- 25 Fc comprende una región de bisagra de inmunoglobulina y los dominios constantes de la cadena pesada CH_2 , CH_3 de inmunoglobulina; y

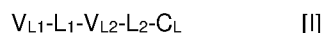
L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son conectores aminoácidos;

en donde el primer y segundo polipéptidos forman un par de cadena ligera-cadena pesada cruzado. En algunas

- 30 realizaciones, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica. En algunas realizaciones, V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica.

En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una primera cadena polipeptídica que comprende una

- 35 estructura representada por la fórmula:



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

- 40 $V_{H2}-L_3-V_{H1}-L_4-CH_1 \quad [II]$

en donde:

V_{L1} es un primer dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

- 45 V_{L2} es un segundo dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V_{H1} es un primer dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

V_{H2} es un segundo dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

CH_1 es un dominio constante de la cadena pesada CH_1 de inmunoglobulina; y

- 50 L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son conectores aminoácidos;

en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par de cadena ligera-cadena pesada cruzado. En algunas realizaciones, V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica. En algunas realizaciones,

- 55 V_{H2} y V_{L2} forman un dominio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, y V_{H1} y V_{L1} forman un dominio de unión a antígeno que se une a otra diana antigénica.

En cualquiera de las proteínas de unión biespecíficas descritas más arriba, el antígeno diana distinto de CD38 puede ser cualquiera de las siguientes dianas antigénicas ejemplares: A2AR, APRIL, ATPDasa, BAFF, BAFFR, BCMA, BlyS, BTK, BTLA, B7DC, B7H1, B7H4 (también conocida como VTCN1), B7H5, B7H6, B7H7, B7RP1, B7-4, C3, C5, CCL2 (también conocida como MCP-1), CCL3 (también conocida como MIP-1a), CCL4 (también conocida como MIP-1b), CCL5 (también conocida como RANTES), CCL7 (también conocida como MCP-3), CCL8 (también conocida como mcp-2), CCL11 (también conocida como eotaxina), CCL15 (también conocida como MIP-1d), CCL17 (también conocida como TARC), CCL19 (también conocida como MIP-3b), CCL20 (también conocida como MIP-3a), CCL21 (también conocida como MIP-2), CCL24 (también conocida como MPIF-2/eotaxina-2), CCL25 (también conocida como TECK), CCL26 (también conocida como eotaxina-3), CCR3, CCR4, CD3, CD19, CD20, CD23 (también conocida como FCER2, un receptor para IgE), CD24, CD27, CD28, CD38, CD39, CD40, CD70, CD80 (también conocida como B7-1),

CD86 (también conocida como B7-2), CD122, CD137 (también conocida como 41BB), CD137L, CD152 (también conocida como CTLA4), CD154 (también conocida como CD40L), CD160, CD272, CD273 (también conocida como PDL2), CD274 (también conocida como PDL1), CD275 (también conocida como B7H2), CD276 (también conocida como B7H3), CD278 (también conocida como ICOS), CD279 (también conocida como PD-1), CDH1 (también conocida como E-cadherina), quitinasa, CLEC9, CLEC91, CRTH2, CSF-1 (también conocida como M-CSF), CSF-2 (también conocida como GM-CSF), CSF-3 (también conocida como GCSF), CX3CL1 (también conocida como SCYD1), CXCL12 (también conocida como SDF1), CXCL13, CXCR3, DNGR-1, ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, EGFR, ENTPD1, FCER1A, FCER1, FLAP, FOLH1, Gi24, GATR, 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 (también conocida como un receptor para IL25), IL18, IL22, IL23, IL25, IL27, IL33, IL35, ITGB4 (también conocida como b4 integrina), ITK, KIR, LAG3, LAMP1, leptina, LPFS2, clase II de MHC, NCR3LG1, NKG2D, NTPDase-1, OX40, OX40L, PD-1H, receptor de plaquetas, PROM1, S152, SIS1, SLC, SPG64, ST2 (también conocida como un receptor para IL33), STEAP2, cinasa Syk, TAC1, TDO, T14, TIGIT, TIM3, TLR, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, TMEF1, TNFa, TNFRSF7, Tp55, TREM1, TSLP (también conocida como un co-receptor para IL7Ra), TSLPR, TWEAK, VEGF, VISTA, Vstm3, WUCAM y XCR1 (también conocida como GPR5/CCXCR1). En algunas realizaciones, una o más de las dianas antigénicas anteriores son dianas antigénicas humanas.

En cualquiera de las proteínas de unión inespecíficas descritas más arriba, puede usarse cualquier conector o combinación de conectores descritos en este documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos uno de L₁, L₂, L₃ o L₄ es independientemente de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ o L₄ es cada uno independientemente de al menos un aminoácido de longitud. En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ es cada uno independientemente de cero aminoácidos de longitud o comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ cada uno independientemente comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ comprende la secuencia S y L₄ comprende la secuencia RT. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ es de 0 aminoácidos de longitud y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ comprende la secuencia GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ es de 0 aminoácidos de longitud y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ es de 0 aminoácidos de longitud, L₃ comprende la secuencia GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56) y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, en cualquiera de las proteínas de unión inespecíficas descritas en este documento, un sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 (por ejemplo, CD38 humano y opcionalmente de macaco cangrejero). En algunas realizaciones, otro u otros sitios de unión a antígeno (por ejemplo, que no se unen a CD38) de cualquiera de las proteínas de unión inespecíficas descritas en este documento se unen a CD28 o CD3. En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el dominio V_{H2} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el dominio V_{H2} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una

secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36). En algunas realizaciones, el dominio V_{H2} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Las proteínas de unión de la divulgación pueden prepararse usando dominios o secuencias obtenidos o derivados de cualquier anticuerpo humano o no humano, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanos, murinos o humanizados.

Conectores

En algunas realizaciones, los conectores L_1 , L_2 , L_3 y L_4 varían de ningún aminoácido (longitud = 0) a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o menos de 100, 50, 40, 30, 20 o 15 aminoácidos o menos. Los conectores también pueden ser de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácido de longitud. L_1 , L_2 , L_3 y L_4 en una proteína de unión pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos o pueden tener todas secuencias de aminoácidos diferentes.

Ejemplos de conectores adecuados incluyen un solo residuo de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro residuos de glicina; un péptido con cinco residuos de glicina; un péptido con seis residuos de glicina; un péptido con siete residuos de glicina; y un péptido con ocho residuos de glicina. Pueden usarse otras combinaciones de residuos aminoacídicos, tal como el péptido GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), el péptido GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), el péptido TKGPS (SEQ ID NO: 57), el péptido GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y el péptido GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). Los ejemplos enumerados anteriormente no pretenden limitar el alcance de la divulgación de ningún modo, y se ha mostrado que conectores que comprenden aminoácidos seleccionados aleatoriamente seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparagina, glutamina, glicina y prolina son adecuados en las proteínas de unión. Para descripciones adicionales de secuencias de conectores, véanse, por ejemplo, los documentos WO2012135345 y WO2017/180913.

La identidad y secuencia de residuos aminoacídicos en el conector puede variar dependiendo del tipo de elemento estructural secundario necesario para conseguir el conector. Por ejemplo, glicina, serina y alanina son los mejores para conectores que tienen flexibilidad máxima. Alguna combinación de glicina, prolina, treonina y serina es útil si es necesario un conector más rígido y agrandado. Cualquier residuo aminoacídico puede considerarse un conector en combinación con otros residuos aminoacídicos para construir conectores peptídicos más grandes según sea necesario dependiendo de las propiedades deseadas.

En algunas realizaciones, al menos uno de L_1 , L_2 , L_3 o L_4 es independientemente de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 o L_4 es cada uno independientemente de al menos un aminoácido de longitud. En algunas realizaciones, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3 . En algunas realizaciones, la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4 . En algunas realizaciones, la longitud de L_1 es al menos dos veces la longitud de L_3 , y la longitud de L_2 es al menos dos veces la longitud de L_4 . En algunas realizaciones, L_1 es de 3 a 12 residuos aminoacídicos de longitud, L_2 es de 3 a 14 residuos aminoacídicos de longitud, L_3 es de 1 a 8 residuos aminoacídicos de longitud y L_4 es de 1 a 3 residuos aminoacídicos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 es de 5 a 10 residuos aminoacídicos de longitud, L_2 es de 5 a 8 residuos aminoacídicos de longitud, L_3 es de 1 a 5 residuos aminoacídicos de longitud y L_4 es de 1 a 2 residuos aminoacídicos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 es de 7 residuos aminoacídicos de longitud, L_2 es de 5 residuos aminoacídicos de longitud, L_3 es de 1 residuo aminoacídico de longitud y L_4 es de 2 residuos aminoacídicos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 es de 10 residuos aminoacídicos de longitud, L_2 es de 10 residuos aminoacídicos de longitud, L_3 es de 0 residuos aminoacídicos de longitud y L_4 es de 0 residuos aminoacídicos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 tienen cada uno una longitud seleccionada independientemente de 0 a 15 aminoácidos (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos), en donde al menos dos de los conectores tienen una longitud de 1 a 15 aminoácidos (por

ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos). En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de 0 aminoácidos de longitud.

En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y/o L₄ comprenden una secuencia derivada de una secuencia de origen natural en la unión entre un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo (por ejemplo, como se describe en el documento WO2012/135345). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conector comprende una secuencia encontrada en la transición entre un dominio V_H y C_{H1} endógeno, o entre un dominio V_L y C_L endógeno (por ejemplo, kappa o lambda). En algunas realizaciones, el conector comprende una secuencia encontrada en la transición entre un dominio V_H y C_{H1} humano endógeno, o entre un dominio V_L y C_L humano endógeno (por ejemplo, kappa o lambda humano).

En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ es cada uno independientemente de cero aminoácidos de longitud o comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ cada uno independientemente comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59).

En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L₂ comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L₃ comprende la secuencia S y L₄ comprende la secuencia RT. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₂ comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L₃ es de 0 aminoácidos de longitud y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₂ comprende la secuencia GGS GSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L₃ es de 0 aminoácidos de longitud y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁ comprende la secuencia GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L₂ es de 0 aminoácidos de longitud, L₃ comprende la secuencia GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56) y L₄ es de 0 aminoácidos de longitud.

Regiones Fc y dominios constantes

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo de longitud completa o una cadena polipeptídica que comprende una región Fc. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc humana, por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región Fc incluye los dominios de anticuerpo de bisagra, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y, opcionalmente, C_{H4}. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana. En algunas realizaciones, la región Fc incluye una o más de las mutaciones descritas más abajo.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación incluye una o dos variantes de Fc. La expresión "variante de Fc", como se usa en este documento, se refiere a una molécula o secuencia que está modificada con respecto a un Fc natural, pero todavía comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor de Fc neonatal). Variantes de Fc ejemplares, y su interacción con el receptor de rescate, son conocidas en la técnica. Por tanto, la expresión "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que está humanizada con respecto a un Fc natural no humano. Además, un Fc natural comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan elementos estructurales o actividad biológica que no son necesarios para las proteínas de unión similares a anticuerpo de la invención. Por tanto, la expresión "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc naturales, o en la que uno o más sitios o residuos de Fc se han modificado, que afectan o están implicados en: (1) la formación de enlaces disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula hospedadora seleccionada, (3) la heterogeneidad aminoterminal tras la expresión en una célula hospedadora seleccionada, (4) la glucosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc distinto de un receptor de rescate, o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunas realizaciones, la región Fc comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión al receptor de Fc y/o la función efectora de la región Fc (por ejemplo, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos mediada por receptores de Fc (ADCP), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)).

En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende una o más sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y/o 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y/o P329A. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299 y/o 300 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son S298N, T299A y/o Y300S.

En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcyl y/o FcylI. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a Fcyl y/o FcylI, pero no afectan a la unión a

FcRn. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son S228P y/o R409K. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y/o 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son F234A y/o L235A. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235 y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son S228P, F234A, L235A y/o R409K. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son E233P, F234V, L235A y una eliminación en 236. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones aminoacídicas en sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236 y/o 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las mutaciones aminoacídicas son S228P, E233P, F234V, L235A y una eliminación en 236; y/o R409K.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, por ejemplo, al modular la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión heterodiméricas pueden purificarse selectivamente de sus formas homodiméricas si una de las dos regiones Fc de la forma heterodimérica contiene una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a la proteína A, porque la forma heterodimérica tendrá una afinidad intermedia para la purificación basada en proteína A distinta de cualquiera de las formas homodiméricas y puede eluirse selectivamente de la proteína A, por ejemplo, mediante el uso de un pH diferente (véase, por ejemplo, Smith, E.J. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:17943). En algunas realizaciones, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son H435R y Y436F. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; y en donde solo una de la primera y la segunda región Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son H435R y Y436F. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la purificación. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

Para mejorar los rendimientos de algunas proteínas de unión (por ejemplo, proteínas de unión biespecíficas), los dominios C_{H3} pueden alterarse mediante la tecnología de "botones en ojales" que se describe en detalle con varios ejemplos en, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 96/027011, Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 617-21; y Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16: 677-81. Específicamente, las superficies de interacción de los dos dominios C_{H3} se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios C_{H3}. Cada uno de los dos dominios C_{H3} (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza más los heterodímeros (Merchant *et al.*, 1998; Atwell *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.* 270: 26-35) y aumenta el rendimiento. En realizaciones particulares, el botón está en un segundo par de polipéptidos con un solo dominio variable. En otras realizaciones, el botón está en el primer par de polipéptidos que tiene la orientación cruzada. En aún otras realizaciones, los dominios C_{H3} no incluyen un botón en ojal.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una mutación de "botón" en una segunda cadena polipeptídica y una mutación de "ojal" en la tercera cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una mutación de "botón" en la tercera cadena polipeptídica y una mutación de "ojal" en una segunda cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, la mutación de "botón" comprende una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y/o 366 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son S354C, T366W, T366Y, S354C y T366W, o S354C y T366Y. En algunas realizaciones, la mutación de "botón" comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son S354C y T366W. En algunas realizaciones, la mutación de "ojal" comprende una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 407 y, opcionalmente, 349, 366 y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son Y407V o Y407T y, opcionalmente, Y349C, T366S y/o L368A. En algunas realizaciones, la mutación de "ojal" comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 349, 366, 368 y 407 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones aminoacídicas son Y349C, T366S, L368A y Y407V.

234, 235, 354, 366 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S228P, F234A, L235A, S354C, T366W y R409K.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (véase, por ejemplo, Hinton, P.R. *et al.* (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). En algunas realizaciones, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son M428L y N434S. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a CH1, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a CH1, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina; en donde la primera y/o segunda región Fc comprenden sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU; en donde las sustituciones aminoacídicas son M428L y N434S. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la estabilidad, por ejemplo, de la superficie de contacto de la región de bisagra y/o dímero de IgG4 (véase, por ejemplo, Spiess, C. *et al.* (2013) J. Biol. Chem. 288:26583-26593). En algunas realizaciones, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S228P y R409K. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a CH1, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a CH1, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina; en donde la primera y segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana; y en donde la primera y segunda región Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S228P y R409K. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la estabilidad. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, por ejemplo, al modular la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión heterodiméricas pueden purificarse selectivamente de sus formas homodiméricas si una de las dos regiones Fc de la forma heterodimérica contiene una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión a la proteína A, porque la forma heterodimérica tendrá una afinidad intermedia para la purificación basada en proteína A distinta de cualquiera de las formas homodiméricas y puede eluirse selectivamente de la proteína A, por ejemplo, mediante el uso de un pH diferente (véase, por ejemplo, Smith, E.J. *et al.* (2015) Sci. Rep. 5:17943). En algunas realizaciones, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son H435R y Y436F. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a CH1, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a CH1, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina; y en donde solo una de la primera y la segunda región Fc comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son H435R y Y436F. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la purificación. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (véase, por ejemplo, Hinton, P.R. *et al.* (2006) J. Immunol. 176(1):346-56). En algunas realizaciones, la mutación comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son M428L y N434S. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a CH1, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a CH1, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina; en donde la primera y/o segunda región Fc comprenden sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones

428 y 434 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU; en donde las sustituciones aminoacídicas son M428L y N434S. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para reducir la función efectora, por ejemplo, la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) mediada por el receptor de Fc, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas realizaciones, una segunda cadena polipeptídica comprende además una primera región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; en donde la tercera cadena polipeptídica comprende además una segunda región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; en donde la primera y segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana; y en donde la primera y segunda región Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A y L235A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y la tercera cadena polipeptídica son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A y L235A. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende además una primera región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; en donde la tercera cadena polipeptídica comprende además una segunda región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; en donde la primera y segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana; y en donde la primera y la segunda región Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y la tercera cadena polipeptídica son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y la tercera cadena polipeptídica son regiones Fc de IgG4 humana, y las regiones Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son F234A y L235A. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende además una primera región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina, y una tercera cadena polipeptídica que comprende además una segunda región Fc unida a C_{H1}, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de la cadena pesada C_{H2} y C_{H3} de inmunoglobulina; y en donde la primera y la segunda región Fc comprenden cada una sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son F234A y L235A.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón y ojal y una o más mutaciones para reducir la función efectora. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana. Para una descripción adicional de mutaciones en Fc en la posición 329, véase, por ejemplo, Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604 y el documento WO1999051642.

En algunas realizaciones, los tipos de mutaciones descritas más arriba pueden combinarse en cualquier orden o combinación. Por ejemplo, una proteína de unión de la presente divulgación puede comprender dos o más de las mutaciones de "botón" y "ojal", mejorando la una o más mutaciones la semivida en suero, mejorando la una o más mutaciones la estabilidad de IgG4, mejorando la una o más mutaciones la purificación y/o reduciendo la una o más mutaciones la función efectora descrita más arriba.

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende un fragmento de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos de anticuerpo F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv o scFv.

Ensayos

La presente divulgación proporciona proteínas de unión a antígeno que se unen a polipéptidos CD38 humanos y/o de macaco, inducen la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T CD4+ y/o CD8+) y/o inducen la apoptosis de células CD38+. En este documento se proporcionan ensayos ejemplares para medir estos parámetros e identificar dichas proteínas de unión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la afinidad de unión entre una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma y un polipéptido CD38 purificado se mide por SPR (por ejemplo, como se describe más abajo), y la afinidad de unión entre una proteína de unión o fragmento de unión a antígeno de la misma

y un polipéptido CD38 expresado en la superficie de una célula se mide por citometría de flujo (por ejemplo, como se describe más abajo).

En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno de una proteína de unión de la presente divulgación se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,8 nM o menos, medida por un ensayo de citometría de flujo usando células que expresan el polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en su superficie celular, por ejemplo, como se describe más abajo. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,75 nM o menos, medida por un ensayo de citometría de flujo usando células que expresan el polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 en su superficie celular, por ejemplo, como se describe más abajo. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,83 nM o menos, medida por un ensayo de SPR usando el polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, como se describe más abajo. En algunas realizaciones, el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 3,5 nM o menos, 1,5 nM o menos, o 1,0 nM o menos, medida por un ensayo de SPR usando el polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, por ejemplo, como se describe más abajo. Como se demuestra en este documento, en algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación puede poseer una o más de las propiedades de unión ejemplares descritas en este documento. En algunas realizaciones, la K_D se mide a 4 °C o 25 °C.

En algunas realizaciones, una proteína de unión monoespecífica de la presente divulgación posee una o más de los siguientes rasgos característicos: se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como proteína purificada, como se ensaya por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) como proteína purificada con una K_D de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, o 1,5 nM o menos, como se ensaya por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula, como se ensaya por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) expresado en la superficie de una célula con una K_D aparente de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos, como se ensaya por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como proteína purificada, como se ensaya por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) como proteína purificada con una K_D de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, como se ensaya por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula, como se ensaya por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30) expresado en la superficie de una célula con una K_D aparente de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, 1 nM o menos, como se ensaya por citometría de flujo; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) como proteína purificada, como se ensaya por SPR o ELISA; se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano de isoforma E (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105) expresado en la superficie de una célula, como se analiza por citometría de flujo; induce apoptosis o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD38 en su superficie celular; y tiene una o más mutaciones (por ejemplo, en una región Fc) que provocan una unión disminuida a FcγRI y/o FcγRII, en comparación con la misma proteína de unión sin la una o más mutaciones. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido CD38 (por ejemplo, humano o de macaco cangrejero) expresado en la superficie de una célula con una CE_{50} de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos, como se ensaya por citometría de flujo. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido CD38 (por ejemplo, humano o de macaco cangrejero) como proteína purificada con una CE_{50} de 20 nM o menos, 15 nM o menos, 12 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 2 nM o menos, o 1 nM o menos, como se ensaya por ELISA. En algunas realizaciones, la K_D se mide a 4 °C o 25 °C.

Ácidos nucleicos

Se usan metodologías convencionales de ADN recombinante para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman las proteínas de unión, incorporar estos polinucleótidos en vectores de expresión recombinante e introducir dichos vectores en células hospedadoras. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3.^a ed.). Pueden realizarse reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se consigue normalmente en la técnica, o como se describe en este documento. Salvo que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada a propósito de, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descrita en este documento son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Asimismo, pueden usarse técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, administración y tratamiento de pacientes.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado está unido de forma funcional a un promotor heterólogo para dirigir la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión. Un promotor puede referirse a secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Una primera secuencia de ácido nucleico está unida de forma funcional a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se pone en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional a una secuencia codificante de una proteína de unión si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. Ejemplos de promotores pueden incluir, aunque sin limitación, promotores obtenidos de los genomas de virus (tales como virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus 40 del simio (SV40) y similares), de promotores eucariotas heterólogos (tales como el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico y similares), el promotor de CAG (Niwa *et al.*, Gene 108(2):193-9, 1991), el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK), un promotor inducible de tetraciclina (Masui *et al.*, Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005), el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, regiones operadoras y promotoras principales de fago lambda, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura y el promotor de los factores de apareamiento alfa de levadura. Los polinucleótidos que codifican proteínas de unión de la presente divulgación pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor inducible o cualquier otro promotor adecuado descrito en este documento u otro promotor adecuado que reconocerá fácilmente un experto en la materia.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado está incorporado en un vector. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden incluir una o más secuencias reguladoras unidas de forma funcional al polinucleótido a expresar. La expresión "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Ejemplos de potenciadores adecuados pueden incluir, aunque sin limitación, secuencias potenciadoras de genes de mamífero (tales como globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, insulina y similares) y secuencias potenciadoras de un virus de células eucariotas (tal como el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación, potenciadores de adenovirus y similares). Ejemplos de vectores adecuados pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, episomas, transposones y vectores víricos (por ejemplo, vectores adenovíricos, del virus de la variolovacuna, del virus Sindbis, del virus del sarampión, del virus del herpes, lentivíricos, retrovíricos, de virus adenoasociados, etc.). Los vectores de expresión pueden usarse para transfectar células hospedadoras, tales como, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células de insecto y células de mamífero. Vectores víricos y plasmídicos de ADN biológicamente funcionales con capacidad de expresión y replicación en un hospedador son conocidos en la técnica, y pueden usarse para transfectar cualquier célula de interés.

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un sistema de vector que comprende uno o más vectores que codifican una primera, segunda, tercera y cuarta cadena polipeptídica de cualquiera de las proteínas de unión descritas en este documento. En algunas realizaciones, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera cadena polipeptídica de la proteína de unión, un segundo vector que codifica la segunda cadena polipeptídica de la proteína de unión, un tercer vector que codifica la tercera cadena polipeptídica de la proteína de unión y un cuarto vector que codifica la cuarta cadena polipeptídica de la proteína de unión. En algunas realizaciones, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y segunda cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas realizaciones, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y tercera cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas realizaciones, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión, y un segundo vector que codifica la segunda y tercera cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. En algunas realizaciones, el sistema de vector comprende un primer vector que codifica la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. El uno o más vectores del sistema de vector puede ser cualquiera de los vectores descritos en este documento. En algunas realizaciones, el uno o más vectores son vectores de expresión.

Células hospedadoras aisladas

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a una célula hospedadora aislada que comprende uno o más polinucleótidos aislados, vectores y/o sistemas de vector descritos en este documento. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana (por ejemplo, una célula de *E. coli*). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de levadura (por ejemplo, una célula de *S. cerevisiae*). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de insecto. Ejemplos de células hospedadoras de insecto pueden incluir, por ejemplo, células de *Drosophila* (por ejemplo, células S2), células de *Trichoplusia ni* (por ejemplo, células High Five™) y células de *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf21 o Sf9). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero. Ejemplos de células hospedadoras de mamífero pueden incluir, por ejemplo, células embrionarias de riñón humano (por ejemplo, células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión), células Expi293TM, células CHO, células de riñón de cría de hámster (por ejemplo, BHK, ATCC CCL 10), células de Sertoli de ratón (por ejemplo, células TM4), células de riñón de mono (por ejemplo, CV1 ATCC CCL 70), células renales de mono verde africano (por ejemplo, VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervicouterino humano (por ejemplo, HELA, ATCC CCL 2), células renales de cánido (por ejemplo, MDCK, ATCC CCL 34), células hepáticas de rata búfalo (por ejemplo, BRL 3A, ATCC CRL 1442), células de pulmón humano (por ejemplo, W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (por ejemplo, Hep G2, HB 8065), células tumorales mamarias de ratón (por ejemplo, MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI, células MRC 5, células FS4, una línea de hepatoma humano (por ejemplo, Hep G2) y células de mieloma (por ejemplo, células NS0 y SP2/0).

Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un método de producción cualquiera de las proteínas de unión descritas en este documento. En algunas realizaciones, el método incluye a) cultivar una célula hospedadora (por ejemplo, cualquiera de las células hospedadoras descritas en este documento) que comprende un ácido nucleico aislado, vector y/o sistema de vector (por ejemplo, cualquiera de los ácidos nucleicos aislados, vectores y/o sistemas de vectores descritos en este documento) en condiciones tales que la célula hospedadora exprese la proteína de unión; y b) aislar la proteína de unión de la célula hospedadora. Los métodos de cultivo de células hospedadoras en condiciones para expresar una proteína son bien conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de aislamiento de proteínas de células hospedadoras cultivadas son bien conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad en dos etapas que comprende cromatografía de afinidad de proteína A seguida de cromatografía de exclusión por tamaño).

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se purifica por cromatografía de afinidad de proteína A, cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (por ejemplo, usando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) y opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (por ejemplo, usando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se purifica por cromatografía de afinidad de proteína A, cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (por ejemplo, usando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) y opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (por ejemplo, usando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare). En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende dos regiones Fc, que comprenden cada una un dominio C_{H3}, y solo uno de los dominios C_{H3} comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son H435R y Y436F. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se purifica por cromatografía de afinidad de proteína A, después cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (por ejemplo, usando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), después opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (por ejemplo, usando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) en secuencia. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se purifica por cromatografía de afinidad de proteína A, después cromatografía de afinidad de cadena ligera lambda (por ejemplo, usando una resina LambdaFabSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare), después opcionalmente cromatografía de afinidad de cadena ligera kappa (por ejemplo, usando una resina KappaSelect de acuerdo con las instrucciones del fabricante; GE Healthcare) en secuencia. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de unión se pone en contacto con proteína A, se eluye de la proteína A en condiciones adecuadas para aislar la proteína de unión de proteínas de unión que comprenden 0 o 2 dominios C_{H3} que comprenden las sustituciones aminoacídicas H435R y Y436F, se pone en contacto con un medio de afinidad de cadena ligera kappa (por ejemplo, como se usa en la resina KappaSelect; GE Healthcare) y se eluye del medio de afinidad de cadena ligera kappa en condiciones adecuadas para aislar la proteína de unión de proteínas de unión que comprenden solo dominios C_L lambda (por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Las condiciones adecuadas para la elución de la proteína A son conocidas en la técnica, incluyendo, sin limitación, un gradiente en elución por etapas de pH 4,5-2,8. En algunas realizaciones, se emplea la proteína A o una variante de proteína A útil para la purificación de proteínas. En algunas realizaciones, la proteína A está unida a un sustrato o resina, por ejemplo, como parte de un medio de cromatografía. En algunas realizaciones, después de la elución del medio de afinidad de cadena ligera kappa, la proteína de unión se pone en contacto con un medio de afinidad de cadena ligera lambda (por ejemplo, como se usa en la resina LambdaFabSelect; GE Healthcare) y se eluye del medio de afinidad de cadena ligera lambda en condiciones adecuadas para aislar la proteína de unión de proteínas de unión que comprenden solo dominios C_L kappa (por ejemplo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se detecta usando cromatografía HIC. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende: una primera cadena de polipéptidos que comprende un dominio C_L lambda; un dominio C_{H3} de una segunda cadena de polipéptidos que comprende

sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humana según el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; un dominio C_{H3} de una tercera cadena de polipéptidos que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 349, 366, 368, 407, 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana según el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, Y407V, H435R y Y436F; y una cuarta cadena de polipéptidos que comprende un dominio C_L kappa. En algunas realizaciones, la proteína de unión se produce por una célula hospedadora. En algunas realizaciones, la proteína de unión se purifica de un medio de cultivo celular o extracto de células hospedadoras. En algunas realizaciones, las proteínas de unión se secretan por una célula hospedadora o se producen y extraen de una célula hospedadora (por ejemplo, antes de ponerse en contacto con la proteína A). En algunas realizaciones, la proteína de unión está en un medio de cultivo celular o extracto de células hospedadoras cuando se pone en contacto con la proteína A. En algunas realizaciones, la proteína de unión se purifica de otras proteínas de unión, polipéptidos y/u otros componentes celulares.

IV. Usos para las proteínas de unión

En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se administra a un paciente que lo necesita para el tratamiento o prevención del cáncer. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno proliferativo, que es cáncer. En algunas realizaciones, comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de las proteínas de unión, o composiciones farmacéuticas relacionadas con las mismas, descritas en este documento. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a al menos una de las proteínas de unión, o composiciones farmacéuticas relacionadas con las mismas, descritas en este documento para su uso para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno proliferativo, que es cáncer, en un paciente que lo necesita. En algunas realizaciones, el paciente es un ser humano. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une a una proteína de superficie de linfocitos T y otro sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, por ejemplo, como se describe en la sección II más arriba. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende un sitio de unión a antígeno que se une al dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano, un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28 humano y un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 humano.

En algunas realizaciones, las células del cáncer expresan un polipéptido CD38 humano de isoforma A en su superficie celular (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las células del cáncer expresan un polipéptido CD38 humano de isoforma E en su superficie celular (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). En algunas realizaciones, el paciente se selecciona para el tratamiento basándose en que las células del cáncer expresan un CD38 humano de isoforma E en su superficie celular (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105). En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y CD28. En algunas realizaciones, las células cancerosas expresan CD38 y no expresan CD28.

En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, linfoma, cáncer de mama tal como cáncer de mama Her2+, cáncer de próstata, linfoma de linfocitos B centrales germinales o leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B. En determinadas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple. En determinadas realizaciones, el cáncer es leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma de linfocitos B.

En determinadas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple. Se han ensayado anticuerpos anti-CD38 para el tratamiento de mieloma múltiple, tales como daratumumab e isatuximab. Sin embargo, aunque el mieloma múltiple se considera tratable, la recidiva es inevitable en casi todos los pacientes, lo que da lugar al desarrollo de enfermedad resistente al tratamiento. En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple recidivante o resistente. En algunas realizaciones, el paciente se ha tratado con un tratamiento previo de mieloma múltiple. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se administra al paciente como un tratamiento de 1.^a, 2.^a o 3.^a línea para mieloma múltiple. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que una proteína de unión anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 de la presente divulgación puede ser útil en el tratamiento de mieloma múltiple, por ejemplo, mediante el reclutamiento de linfocitos T hacia células tumorales a través de anti-CD38 (o anti-CD28/anti-CD38), la activación de linfocitos T acoplados a través de anti-CD3/anti-CD28, y/o la destrucción de células tumorales a través de mecanismos basados en perforina/granzima. Se ha informado que CD28 es un marcador canceroso novedoso para mieloma múltiple. Véase Nair, J.R. *et al.* (2011) J. Immunol. 187:1243-1253.

En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión se administra (o tiene que administrarse) en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos (por ejemplo, cualquier tratamiento antineoplásico conocido en la técnica, tal como un agente o tratamiento quimioterápico). En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión se administra (o tiene que administrarse) antes del uno o más tratamientos antineoplásicos. En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión se administra (o tiene que administrarse) simultáneamente con el uno o más tratamientos antineoplásicos. En algunas realizaciones, la al menos una proteína de unión se administra (o tiene que administrarse) después del uno o más tratamientos antirretrovíricos.

V. Composiciones terapéuticas de proteína de unión y administración de las mismas

Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden proteínas de unión están dentro del alcance de la divulgación. Dichas composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión, o conjugado de proteína de unión-fármaco, en mezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado por su idoneidad con el modo de administración.

Materiales de formulación aceptables son preferentemente atóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones empleadas.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Materiales de formulación adecuados incluyen, aunque sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), agentes antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos), agentes de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), rellenos, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas), colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, tiomersal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alditos (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina; lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos - preferiblemente cloruro de sodio o potasio - o manitol sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18.^a Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores del mismo).

La composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la materia dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosis deseada. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de depuración *in vivo* de la proteína de unión.

El vehículo o excipiente principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o excipiente adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Vehículos adicionales ejemplares son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con seroalbúmina. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la divulgación, las composiciones de proteína de unión pueden prepararse para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, la proteína de unión puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados, tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden seleccionarse para administración parenteral o subcutánea. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de las habilidades de la técnica.

Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

Cuando se contempla administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso pueden estar en forma de una solución acuosa apirógena, aceptable por vía parenteral, que comprende la proteína de unión deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que una proteína de unión se formula como una solución isotónica estéril, apropiadamente conservada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), esferas o liposomas, que proporcionan liberación controlada o mantenida del producto que entonces puede administrarse mediante inyección de absorción retardada. También puede usarse ácido hialurónico, y este puede tener el efecto de promover la duración mantenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos implantables de administración de fármacos.

En una realización, una composición farmacéutica puede formularse para inhalación. Por ejemplo, una proteína de unión puede formularse como un polvo seco para inhalación. También pueden formularse soluciones para inhalación de proteína de unión con un propulsor para la administración de aerosol. En otra realización más, pueden nebulizarse las soluciones.

También se contempla que determinadas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la divulgación, las proteínas de unión que se administran de este modo pueden formularse con o sin los vehículos habitualmente usados en la formulación de formas farmacéuticas sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, una cápsula puede diseñarse para liberar la parte activa de formulación en el punto del tubo gastrointestinal en que la biodisponibilidad es máxima y la degradación presistémica es mínima. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la proteína de unión. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de proteínas de unión en una mezcla con excipientes atóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Excipientes adecuados incluyen, aunque son limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa o fosfato de calcio; o aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas adicionales de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia, incluyendo formulaciones que implican proteínas de unión en formulaciones de administración mantenida o controlada. Las técnicas para formular una diversidad de otros medios de administración mantenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables o microesferas porosas e inyecciones de absorción retardada, también son conocidas por los expertos en la materia. Ejemplos adicionales de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación mantenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, poli(2-hidroxietil-metacrilato), etileno-acetato de vinilo o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación mantenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas a usar para administración *in vivo* típicamente deben ser estériles. Esto se puede conseguir por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse antes de, o después de, la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales en general se colocan en un recipiente que tiene una vía de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que la composición farmacéutica se ha formulado, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de su administración.

La divulgación también engloba kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta divulgación kits que contienen jeringas precargadas de una y múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas y liojeringas de líquidos).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de proteína de unión a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Por tanto, un experto en la materia apreciará que los niveles de dosis apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se usa la proteína de unión, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y el estado (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el profesional clínico puede valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La frecuencia de administración dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión en la formulación que se esté usando. Típicamente, un profesional clínico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. Por lo tanto, la composición puede administrarse como una sola dosis, como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo o catéter de implante. El ajuste adicional de la dosis apropiada lo hace rutinariamente el experto en la materia y está dentro del ámbito de las tareas rutinariamente realizadas por ellos. Pueden determinarse dosis apropiadas mediante el uso de datos apropiados de respuesta a la dosis.

La vía de administración de la composición farmacéutica es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral; a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intrarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación mantenida; o por dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse por inyección en embolada o continuamente por infusión, o por dispositivo de implante.

La composición también puede administrarse de forma local por implante de una membrana, esponja u otro material apropiado en el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser por difusión, bolo de adsorción lenta o administración continua.

Ejemplos

Los ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones específicas de la divulgación, y diversos usos de las mismas. Los anticuerpos triespecíficos no forman parte de la presente

invención.

La siguiente terminología puede usarse indistintamente en los ejemplos y los dibujos en este documento para referirse a dominios o anticuerpos de unión a antígeno anti-CD38 específicos:

antiCD38_C2-CD38-1: mAb1
 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 o 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 o CD38_{HHY1370}: mAb6
 antiCD38_SB19 o isatuximab: mAb7.

Ejemplo 1: Generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-CD38

Los ejemplos que siguen describen la generación y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-CD38. Ventajosamente, los anticuerpos proporcionados en este documento reaccionan de forma cruzada con proteínas CD38 humanas y de mono, proporcionando de este modo moléculas que pueden usarse tanto para estudios de seguridad como clínicos. Estos anticuerpos también pueden destruir células CD38+ por apoptosis y citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

Este ejemplo describe un flujo de trabajo eficaz para generar anticuerpos monoclonales específicos de CD38 y de reactividad cruzada a partir de linfocitos B murinos individuales.

Materiales y métodos

Generación de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos contra CD38 humano se generaron usando el dominio extracelular de CD38 humano R45-I300 (SEQ ID NO: 1). Véase Q. Liu, I. Krilksunov, R. Graeff, C. Munshi, H.C. Lee, y Q. Hao 2005 Structure 13:: 1331-1339. El inmunógeno se administró directamente, con un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria, a ratones BalbC normales o a ratones transgénicos Trianni Mice™ (Trianni, San Francisco, CA) que comprenden ADN que codifica regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana.

Se usaron diversas proteínas CD38 recombinantes derivadas de la isoforma A con diferentes marcas y mutaciones puntuales (SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 28), y una versión marcada de la isoforma E de CD38 (SEQ ID NO: 105) que abarcan el dominio extracelular de CD38 de R45-P203. Las proteínas se produjeron mediante expresión transitoria en células de mamífero. Las secuencias de ADN codificantes se clonaron en plásmidos de expresión de mamífero bajo el control del potenciador/promotor de CMV y señales de poliA de SV40. Se transfectaron de forma transitoria células HEK293 (Invitrogen; n.º K9000-10) con los plásmidos de expresión usando el sistema de expresión FreeStyle™ MAX 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Inmunización de ratones y selección de linfocitos B

Los anticuerpos anti-CD38 también se aislaron directamente de linfocitos B positivos al antígeno sin fusión a células de mieloma. Usando este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-CD38, tales como mAb1 (véase SEQ ID NO: 5 y 6 para las secuencias de VH y VL, respectivamente, y SEQ ID NO: 7 y 8 para las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente). En resumen, ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad (S082342; Charles River Labs, Bar Harbor, ME) recibieron cada uno tres rondas de inmunización a lo largo de un ciclo de 41 días usando el método clásico como se describe por A. Wennerberg *et al.* (1993 Am. J. Pathol. 143:1050-1054). El antígeno se administró por vía intraperitoneal al sitio ventral de los ratones. Tres días después de la última inyección, los ratones

se sacrificaron y se aislaron asépticamente los bazo y se lavaron con medio RPMI reciente. Los linfocitos se liberaron de los bazo y la suspensión unicelular se lavó dos veces con medio RPMI antes de clasificarse usando una estrategia de clasificación de cuatro colores que incluía un panel de anticuerpos fluorescentes y proteínas CD38 humanas y de mono dobles, y luego se separaron usando clasificación de células por citometría de flujo para aislar los linfocitos B específicos de CD38-IgG con reactividad cruzada entre ser humano/mono. Las células individuales se clasificaron directamente en tubos de PCR para amplificar pares afines de genes de VH y VL mediante RT-PCR (T. Tiller, C. Busse y H. Wardemann 2009 J. Immunol. Methods 350:183-193). El ADN resultante se secuenció.

El ADN resultante se clonó en un vector de expresión de mamífero que codificaba respectivamente IgG1 humana o los dominios Ck humanos para su expresión transitoria en células HEK293 usando el sistema de expresión FreeStyle™ MAX 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lotes se purificaron por cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect, GE Healthcare). El eluido se dializó frente a PBS antes de la filtración en condiciones estériles y almacenamiento a 4 °C.

Generación de anticuerpos por inmunización en ratones transgénicos de inmunoglobulina humana y selección utilizando tecnología de hibridoma

Las inmunizaciones, la fusión y el cribado se realizaron utilizando células de mieloma P3X63-Ag8.653 con el dominio extracelular de CD38 humano como se describe en Kilpatrick *et al.* 1997 Hybridoma 16: 381389. Usando el método RIMMS descrito por Kilpatrick *et al.*, ratones transgénicos Trianni Mice™ hembra de 6-8 semanas de edad que comprenden ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana recibieron cada una cuatro ciclos de inmunización durante un transcurso de 14 días a intervalos de 3-4 días. La proteína CD38 emulsionada en adyuvante de RIBI (Sigma n.º T2684) se administró por vía subcutánea a seis sitios proximales a los ganglios linfáticos drenantes, a lo largo del lomo de los ratones y a seis sitios yuxtapuestos a lo largo del abdomen. Cuatro días después de la última inyección, los ratones se sacrificaron. Los ganglios linfáticos poplíteos bilaterales, inguinales superficiales, axilares y branquiales se aislaron asépticamente y se lavaron con medio RPMI reciente. Los linfocitos se liberaron de los ganglios linfáticos y la suspensión unicelular se lavó dos veces con medio RPMI antes de fusionarse con células de mieloma P3X63-Ag8.653 usando polietilenglicol. Después de la fusión, la mezcla celular se incubó en un estufa de incubación a 37 °C durante 16-24 horas. La preparación celular resultante se transfirió a medio semisólido selectivo, se sembró asépticamente en placas de Petri de 100 mm y se incubó a 37 °C. Diez días después del inicio de la selección, las placas se examinaron para detectar el crecimiento del hibridoma, y se recogieron colonias visibles y se colocaron en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de medio de crecimiento. Las placas de 96 pocillos se mantuvieron en una estufa de incubación a 37 °C durante 2 a 4 días. Usando esta técnica, y el inmunógeno descrito anteriormente, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-CD38 tales como mAb 6 (véase SEQ ID NO: 9 y 10 para las secuencias de VH y VL, respectivamente, y SEQ ID NO: 11 y 12 para las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente). Las secuencias de VH y VL se recuperaron por RT-PCR y se produjo mAb 6 mediante expresión transitoria como se describe anteriormente.

Afinidad de unión a dominios extracelulares de CD38 solubles

Las propiedades de unión de los mAb anti-huCD38 se evaluaron usando un BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ). En resumen, se acopló un chip biosensor CM5 BIAcore en el instrumento y se activó con 250 µl de NHS/EDC 1:1 a temperatura ambiente. Se inmovilizó una IgG1 de ratón anti-Fc humano (GE Healthcare n.º BR-1008-39) (13,5 µg/ml en tampón acetato 0,05 M, PH5) en los chips activados en las cubetas de flujo 1. La inmovilización se llevó a cabo a un caudal de 5 µl/min. A continuación, el chip se bloqueó mediante inyección de 55 µl de etanolamina-HCl, pH 8,5, seguido de cinco lavados con NaOH 50 mM, NaCl 1 M. Para medir la unión de los mAb anti-CD38 a la proteína CD38 humana o la proteína CD38 de macaco, se usando anticuerpos a 2 µg/ml en tampón de migración BIAcore (HBS-EP). Se inyectaron antígenos (CD38 humano-histag (ID2) o CD38 de macaco-histag (ID3)) de 3 a 1000 nM. Una vez completada la fase de inyección, se supervisó la disociación en un tampón de migración BIAcore al mismo caudal durante 360 s. La superficie se regeneró entre inyecciones usando 30 µl de NaOH 50 mM-NaCl 1 M. Los sensogramas individuales se analizaron usando el programa informático BIASimulation.

Afinidad de unión a linfocitos pre-B que expresan CD38 humano

La unión de anticuerpos anti-CD38 a CD38 expresado en la superficie de linfocitos murinos recombinantes preB::300.19 se determinó por citometría de flujo. La línea celular recombinante se describió por J. Deckert *et al.* 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Se recubrieron linfocitos murinos preB::300.19 que expresaban CD38 a 40 000 células/pocillo en una placa de alta unión de 96 pocillos (MSD L15XB-3) y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpos anti-CD38 durante 45 min a 4 °C y se lavaron tres veces con BSA al 1 % en PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; n.º 109-545-098) durante 45 min a 4 °C y se lavaron tres veces con BSA al 1 % en PBS. La unión del anticuerpo se evaluó después de centrifugación y resuspensión de las células añadiendo 200 µl/pocillo de BSA al 1 % en PBS y se leyó usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron usando el programa informático BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Resultados

La unión del mAb1 recién aislado a células SU-DHL-8 o MOLP-8 humanas se comparó con la de isatuximab usando citometría de flujo (figura 1A). Ambos anticuerpos presentaron unión de alta afinidad a ambas líneas celulares. Sin embargo, solo mAb1 pudo unirse a células que expresaban CD38 de macaco cangrejero en su superficie (figura 1B).

La unión a dominios extracelulares solubles de polipéptidos CD38 humanos y de macaco cangrejero se examinó para detectar los anticuerpos mAb1 y mAb6 recién aislados usando resonancia de plasmones superficiales (SPR). Los resultados de SPR se resumen en la tabla A.

Tabla A. Afinidad de unión de anticuerpos al dominio extracelular soluble de hCD38 y cCD38 como se determina por ensayo 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

También se usó citometría de flujo para examinar la unión de los anticuerpos anti-CD38 mAb1 y mAb6 a linfocitos murinos pre-B que expresan polipéptido CD38 humano o de macaco cangrejero en su superficie celular. Los resultados se muestran en la tabla B. Ambos anticuerpos ensayados presentaron unión de alta afinidad a linfocitos preB::300.19 que expresaban huCD38 o cCD38.

Tabla B. Afinidad de unión de anticuerpos a hCD38 o cCD38 expresado por linfocitos murinos preB::300.10 como se determina por citometría de flujo.

	KD aparente por FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
mAb1	2,80E-10	2,20E-10
mAb6	2,07E-09	1,14E-09

Estos resultados demuestran la generación de anticuerpos que se unen con alta afinidad tanto a polipéptidos CD38 humanos como de macaco. Estos anticuerpos, a diferencia de otros anticuerpos anti-CD38, reaccionan de forma cruzada con polipéptidos CD38 humanos y de macaco en forma extracelular soluble o expresados en la superficie de células de mamífero.

Ejemplo 2: Diseño *in silico* de variantes anti-CD38 humanizadas

Este ejemplo describe la humanización de anticuerpos generados en el ejemplo 1.

Las secuencias de los dominios variables de mAb1 se analizaron *in silico*. La definición del sistema internacional de información ImMunoGeneTics para inmunoglobulinas (IMGT) se usó para identificar regiones determinantes de la complementariedad (CDR).

En primer lugar, en paralelo, se emprendieron búsquedas para identificar la combinación más cercana de secuencia proteínica de la línea germinal de ratón y de la línea germinal humana para cada cadena variable. Esto se realizó usando una búsqueda en Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) frente a bases de datos de secuencias proteínicas de la línea germinal de ratón y humana. Para cada cadena de anticuerpo, se encontraron las secuencias proteínicas de ratón y humanas de V y J más cercanas. La calificación de esta identidad de secuencia proteínica alta se midió por el porcentaje de identidad de la región V. Los resultados de las búsquedas de la cadena ligera y pesada de mAb1 se presentan en las tablas C y D, respectivamente.

Tabla C. Secuencias proteínicas de la línea germinal humana y de ratón de la cadena ligera variable (V y J) más cercanas de mAb1.

Especie	Alelo de V	Identidad de la región V (%)	Alelo de J
[Homo sapiens]	IGKV4-1*01 (imgt) <i>Funcional</i>	66,34 %	IGKJ1*01 (imgt) <i>Funcional</i>
Mejores líneas germinal funcionales			
[Mus musculus]	IGKV3-10*01 (imgt) <i>Funcional</i>	96,97 %	IGKJ1*01 (imgt) <i>Funcional</i>

Especie	Alelo de V	Identidad de la región V (%)	Alelo de J
Mejores líneas germinales funcionales			

Tabla D. Secuencias proteínicas de la línea germinal humana y de ratón de la cadena pesada variable (V y J) más cercanas de mAb1.

Especie	Alelo de V	Identidad de la región V (%)	Alelo de J
[Homo sapiens]	IGHV1-3*01 (imgt) <i>Funcional</i>	69,39 %	IGHJ4*01 (imgt) <i>Funcional</i>
Mejores líneas germinales funcionales			
[Mus musculus]	IGHV1-12*01 (imgt) <i>Funcional</i>	87,76 %	IGHJ3*01 (imgt) <i>Funcional</i>
Mejores líneas germinales funcionales			

A continuación, se cribaron las secuencias del dominio variable de mAb1 para detectar predisposiciones de secuencia, tales como sitios de desamidación, escisión con ácido, oxidación o formación de isoaspartato. La estructura de mAb1 se ha analizado mediante modelado 3D por homología para definir la manera en que los residuos aminoácidos interactúan de manera intra o intermolecular. Esta etapa dio lugar a la identificación de un grupo de residuos aminoácidos que son estructuralmente importantes para las funcionalidades de mAb1, como la conformación de las CDR y la unión al antígeno. Estos residuos aminoácidos se seleccionaron para que estuvieran presentes en las secuencias variables de mAb1 humanizado.

Las CDR del mAb1 murino precursor se injertaron en las regiones flanqueantes relevantes. En función de los análisis anteriores, se seleccionaron IGKV3-20*02 humano acoplado con IGKJ1*01 e IGHV1-3*01 humano acoplado con IGHJ4*01 para que fueran la base para la humanización de la cadena ligera variable y la cadena pesada variable de mAb1, respectivamente. La cadena ligera de mAb1 presentó una identidad de un 64,52 % sobre la región V con la línea germinal de IGKV3-20*02 humano seleccionada. La cadena pesada de mAb1 presentó una identidad de un 69,39 % sobre la región V con la línea germinal de IGHV1-3*01 humano seleccionada. Durante el proceso de humanización, las CDR del mAb1 murino precursor se trasplantaron entre las regiones flanqueantes de la línea germinal seleccionadas para recomponer secuencias variables de anticuerpo convencionales. Se prestó atención al grupo identificado previamente de residuos aminoácidos de mAb1 que son estructuralmente importantes para sus funcionalidades, como se indicó anteriormente. Si era necesario, esos residuos aminoácidos se remplazaron en las secuencias recién creadas por su residuo de mAb1 exacto correspondiente. Esto corresponde a una etapa de retromutación para incorporar los residuos aminoácidos de la secuencia precursora adecuados. Se incorporaron algunas mutaciones de CDR tanto para humanizar como para evitar predisposiciones de secuencia en CDR precursoras. Las secuencias variables ligeras y pesadas recién creadas se usaron para generar modelos de homología 3D de la región variable de mAb1 humanizada. Los modelos 3D se construyeron usando Model Antibody Framework del paquete BIOVIA Discovery Studio.

Basándose en la estrategia de injerto de CDR, se generaron dos variantes para la cadena ligera variable (VL1 y VL3) y cuatro variantes para la cadena pesada variable (VH1, VH3, VH5 y VH6). La combinación particular de residuos aminoácidos que varían entre secuencias ligeras y pesadas variables de mAb1 y sus versiones humanizadas se exponen en la tabla E y la tabla F, respectivamente.

Tabla E. Diferencias de secuencia entre la cadena ligera variable de mAb1 y variantes humanizadas.

Regiones de Ig (IMGT)	VL de mAb1 precursor	VL1 humanizado	VL3 humanizado
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	E
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

Tabla F. Diferencias de secuencia entre la cadena pesada variable de mAb1 y variantes humanizadas.

Regiones de Ig (IMGT)	VH de mAb1 precursor	VH1 humanizado	VH3 humanizado	VH5 humanizado	VH6 humanizado
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

5

La variante de VL1 humanizada con SEQ ID NO: 14 presenta un total de 22 mutaciones (18 en FR y 4 en CDR) en comparación con la VL precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 6. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGKV3-20*02 acopladas con IGKJ1*01 con 8 retromutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana. Se mutaron cuatro posiciones de las CDR precursoras para aumentar la tasa de humanización o evitar predisposiciones de secuencia.

10

La variante de VL3 humanizada con SEQ ID NO: 18 presenta un total de 18 mutaciones (18 en FR) en comparación con la VL precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 6. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGKV3-20*02 acopladas con IGKJ1*01 con 8 retromutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana.

15

La variante de VH1 humanizada con SEQ ID NO: 13 presenta un total de 17 mutaciones (14 en FR y 3 en CDR) en comparación con la VH precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 11 retromutaciones realizadas

20

debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana. Se mutaron tres posiciones de las CDR precursoras para aumentar la tasa de humanización o evitar predisposiciones de secuencia.

- 5 La variante de VH3 humanizada con SEQ ID NO: 17 presenta un total de 14 mutaciones (*14 en FR*) en comparación con la VH precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 11 retromutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana.
- 10 La variante de VH5 humanizada con SEQ ID NO: 21 presenta un total de 11 mutaciones (*11 en FR*) en comparación con la VH precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 14 retromutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana.
- 15 La variante de VH6 humanizada con SEQ ID NO: 23 presenta un total de 12 mutaciones (*12 en FR*) en comparación con la VH precursora de la secuencia de mAb1 con SEQ ID NO: 5. Esta variante derivó de regiones flanqueantes de líneas germinales humanas IGHV1-3*01 acopladas con IGHJ4*01 con 13 retromutaciones realizadas debido al riesgo de impacto negativo sobre la estructura del mAb, la conformación de las CDR y, por lo tanto, sobre la unión a su diana.
- 20 Las secuencias variables humanizadas ligeras y pesadas resultantes se analizaron para determinar la similitud de secuencia con la base de datos Immune Epitope Data Base (IEDB) ((PLoS Biol (2005) 3(3)e91) www.iedb.org) para garantizar que ninguna de las secuencias contenía ningún epítipo de linfocitos B o T conocido enumerado en la misma.
- 25 Las secuencias variables de aminoácidos completas de mAb1 y los dominios variables ligeros y pesados humanizados se exponen en la tabla G. Estos dominios variables ligeros y pesados humanizados se han combinado para generar varias versiones humanizadas de dominios variables precursores de mAb1. Los dominios variables de mAb2 corresponden a la asociación de VH1 humanizada combinada con VL1 humanizada. Los dominios variables de mAb3 corresponden a la asociación de VH3 humanizada combinada con VL3 humanizada. Los dominios variables de mAb4 corresponden a la asociación de VH5 humanizada combinada con VL3 humanizada. Los dominios variables de mAb5 corresponden a la asociación de VH6 humanizada combinada con VL3 humanizada. Las proteínas de unión triespecíficas mostradas en la tabla G se describen con mayor detalle en el ejemplo 4.
- 30
- 35 Las secuencias correspondientes de ADN codificante de las variantes de VH y VL humanizadas descritas anteriormente se clonaron en un vector de expresión de mamífero que codificaba respectivamente IgG1 humana o los dominios Ck humanos para la expresión transitoria y purificación como se describe en el ejemplo 1. Las secuencias amino de las variantes anti-CD38 humanizadas de longitud completa derivadas de mAb1 se enumeran como mAb2 (cadena pesada: HC1, SEQ ID NO: 15; cadena ligera: LC1, SEQ ID NO: 16), mAb3 (cadena pesada: HC3, SEQ ID NO: 19; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20), mAb4 (cadena pesada: HC5, SEQ ID NO: 22; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20) y mAb5 (cadena pesada: HC6, SEQ ID NO: 24; cadena ligera: LC3, SEQ ID NO: 20).
- 40

Ejemplo 3: Reactividad cruzada e inducción de apoptosis de anticuerpos anti-CD38

- 45 A continuación, las variantes anti-CD38 humanizadas generadas en el ejemplo 2 se caracterizaron por la unión a polipéptidos CD38 humanos y de macaco e inducción de la apoptosis.

Materiales y métodos

Ensayo de inducción de la apoptosis

- 50 Las células se incubaron a 2×10^5 células/ml en medio completo (RPMI-1640, 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM) con 1,5 µg/ml (10 nM) de los anticuerpos indicados durante 20 horas a 37 °C con un 5 % de CO₂. Las células se tiñeron con anexinaV-FITC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las muestras se analizaron por citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSAria™ con el programa informático BD FACSDiva para el control de adquisición y el análisis de datos (ambos BD Biosciences).
- 55

Resultados

- 60 Se examinaron las propiedades de unión de anticuerpos anti-CD38 humano seleccionados producidos como se describe anteriormente (**figura 2A-2H**). La unión de anticuerpos a CD38 humano y CD38 de macaco cangrejero soluble se examinó usando ELISA y SPR. Los datos de ELISA se usaron para determinar la CE₅₀ de la unión del anticuerpo a CD38 humano y de macaco cangrejero para los anticuerpos humanizados anti-CD38 mAb2 (**figura 2A**), mAb3 (**figura 2C**), mAb4, mAb5 (**figura 2E**) y el anticuerpo humano anti-CD38 mAb6 (**figura 2I**).
- 65 La unión de las variantes anti-CD38 humanizadas o mAb humano anti-CD38 a CD38 también se evaluó usando el ensayo SPR descrito anteriormente. Los datos de SPR se usaron para determinar la K_D y la k_{off} de unión del anticuerpo

a CD38 humano y de macaco cangrejero para los anticuerpos humanizados anti-CD38 mAb2 (**figura 2B**), mAb3 (**figura 2D**), mAb4, mAb5 (**figura 2F**) y el anticuerpo humano anti-CD38 mAb6 (**figura 2H**). Los datos de unión se resumen en la tabla K que muestra que todos los mAb anti-CD38 se unen a CD38 con características de unión similares.

5 Tabla K. Afinidad de unión de mAb anti-CD38 al dominio extracelular soluble de CD38 humano y CD38 de macaco como se determinada por ensayo de resonancia de plasmones superficiales.

	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
mAbS	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

10 La capacidad de las variantes anti-CD38 humanizadas de unirse a células que expresan CD38 se evaluó usando el ensayo de unión basado en FACS descrito anteriormente. Los datos de FACS se usaron para determinar la CE50 de la unión del anticuerpo a CD38 humano y de macaco cangrejero para los anticuerpos humanizados anti-CD38 mAb2 (**figura 2A**), mAb3 (**figura 2C**), mAb4, mAb5 (**figura 2E**) y el anticuerpo humano anti-CD38 mAb6 (**figura 2G**). Los datos de unión, expuestos en la tabla L, muestran que todas las variantes anti-CD38 humanizadas presentaron afinidades de unión similares por CD38 de superficie celular.

15 Tabla L. Afinidad de unión de mAb anti-CD38 a linfocitos murinos preB::300.19 que expresan CD38.

	KD aparente por FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan 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

20 Los datos de unión de los tres ensayos se resumen en la **figura 2I**, junto con la identidad de secuencia de los dominios VH y VL con respecto a las regiones V humanas.

A continuación se examinaron las capacidades del anticuerpo mAb1 precursor y mAb7 de inducir la apoptosis. Ambos anticuerpos aumentaron la tinción de anexina V y la captación de yoduro de propidio (PI). Un 40 % de las células se volvieron doblemente positivas para anexina V y PI después del tratamiento con mAb7, mientras que un 60 % de las células tratadas con mAb1 fueron doblemente positivas. Ambos anticuerpos presentaron un efecto apoptótico dependiente de la concentración similar en células SU-DHL-8 (**figura 2J**). Asimismo, ambos anticuerpos promovieron la actividad ADCC contra células SU-DHL-8 en presencia de células NK92 (**figura 2K**), lo que dio lugar a una citotoxicidad de hasta un 60 % y una CI50 de 4-6 pM después de 4 horas a 37 °C (**figura 2L**).

30 Se identificó *in silico* una isoforma E de CD38 y se validó a nivel de transcripción a partir de linfocitos NK, PBMC y BMMC de pacientes con mieloma múltiple y líneas celulares cancerosas (MOLP-8, CU1702 y CU2332). La isoforma E de CD38 se evidenció mediante un cribado de la base de datos de secuencias nucleicas usando el programa BLASTN 2.2.26 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) en la base de datos de transcripciones Human RefSeq versión 20131216. El programa BLASTN se aplicó sin enmascarar regiones de baja complejidad de secuencia y considerando al menos: un 98,5 % de identidad con la secuencia nucleica de la isoforma A de CD38 humano en un tramo de 100 residuos de ácido nucleico de longitud mínima. Las secuencias resaltadas de este cribado se realinearon con el locus del gen de CD38 para validarse como formas transcripcionales del gen de CD38 humano (misma estructura genómica de

intrones-exones). La secuencia nucleica de la isoforma E de CD38 fue una de las secuencias validadas como formas transcripcionales del gen de CD38 humano.

También se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-CD38 de unirse a ambas isoformas A y E de CD38 humano. Para evaluar la unión a la isoforma A y la isoforma E de CD38, se realizó un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) usando proteínas de la isoforma A e isoforma E (preparadas como se describe en el ejemplo 1) como antígeno de captura. Se recubrieron placas de 96 pocillos con cualquier isoforma a 0,5 µg/pocillo en PBS y se añadieron 100 µl/pocillo de los anticuerpos a la placa. La placa se incubó a 37 °C durante 1 h y se lavó cinco veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (PBS-T). A continuación, 100 µl de una dilución 1:25 000 de IgG anti-humano, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Jackson Ref: 109-035-098) se añadió a cada pocillo. Después de la incubación a 37 °C durante 1 h en la oscuridad, las placas se lavaron con PBS-T cinco veces. La unión del anticuerpo se visualizó añadiendo tampón TMB-H₂O₂ y se leyó a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de CE50 se estimaron usando el programa informático BIOSTAT-SPEED.

Se determinó la afinidad de unión de diversos anticuerpos a la isoforma A (SEQ ID NO: 1) y la isoforma E (SEQ ID NO: 105) de CD38, como se muestra en la tabla L2. La tabla M proporciona una comparación de las propiedades de unión para diversos anticuerpos anti-CD38.

Tabla L2. Afinidad de unión de anticuerpos anti-CD38 por las isoformas A y E de CD38, en función de la CE50 como se determina por ELISA.

Anticuerpo	CE50 de isoforma A de CD38 (nM)	CE50 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 %)	Sin unión

Tabla M. Características de unión de diversos anticuerpos anti-CD38.

Anti-CD38	H11 (Santa Cruz)	Daratumumab	mAb7	mAb1	mAb6
Unión a la isoforma A de huCD38	+	+	+	+	+
Unión a la isoforma E de huCD38	+	-	-	+	+
Unión a CD38 de macaco	+	-	-	+	+

En conclusión, tanto mAb7 como mAb1 inducen una apoptosis similar en células de mieloma múltiple humano MOLP-8, efecto apoptótico dependiente de la concentración similar contra células SU-DHL-8 y actividad ADCC dependiente de la concentración similar contra células SU-DHL-8. Sin embargo, solo mAb1 se unió a CD38 tanto humano como de macaco cangrejero con afinidad subnanomolar y se unió a las isoformas A y E de CD38.

La capacidad de las variantes anti-CD38 humanizadas de inducir la apoptosis también se evaluó mediante clasificador de células activadas con fluorescencia (FACS) como se describe anteriormente. Se han identificado previamente varios anticuerpos anti-CD38 con diversas propiedades funcionales, mientras que algunos de estos pueden mediar la destrucción *in vitro* de líneas celulares CD38+ mediante impacto directo en la proliferación celular o la apoptosis. Los resultados de los ensayos de inducción de apoptosis se muestran en la **figura 2M**. Todos los anticuerpos generados en los ejemplos 1 y 2 pudieron inducir la apoptosis, excepto mAb6. Los anticuerpos anti-CD38 mAb2, mAb3, mAb4 y mAb5 dieron lugar a una inducción de la apoptosis dependiente de la dosis en células de linfoma SU-DHL-8; la CI50 para cada anticuerpo se proporciona en las **figuras 2N-2Q**.

Ejemplo 4: Generación de proteínas de unión triespecíficas anti-CD38

A continuación, se analizaron las propiedades de unión de los dominios de unión a antígeno de anticuerpos anti-CD38 seleccionados descritos en los ejemplos 1-3 en el formato triespecífico mostrado en la **figura 3A**.

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se ensayaron en formato triespecífico (anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3) para determinar la capacidad de unirse a CD38 cuando otros dominios de unión a antígeno se unen a sus ligandos afines usando SPR. El ensayo de unión secuencial a ligando se muestra en la **figura 3B**. Para la unión secuencial de los tres antígenos a cada Ab triespecífico, se inyectó una concentración saturante (>10 KD) de cada antígeno durante 8 min, seguida de una disociación de 5 min. El regenerado superficial se realizó inyectando glicina-HCl 10 mM pH 2,5 durante 60 s a 30 µl/min. Los datos se ajustaron con un modelo de unión cinética 1:1 y se analizaron utilizando el programa informático de evaluación Biacore S200 v 1.0. La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó utilizando la constante de velocidad de asociación (k_{on}) y la constante de velocidad de disociación (k_{off}).

Como se muestra en la **figura 3C**, este ensayo basado en SPR mostró que las proteínas de unión triespecíficas podían unirse a CD38 independientemente de si los dominios de unión a antígeno CD3 y/o CD28 también se unieron a su

antígeno afín. Los resultados de un ensayo de unión secuencial ejemplar se muestran en la **figura 4**. Los parámetros cinéticos medidos por SPR se proporcionan en la tabla M2.

Tabla M2. Unión de proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 a 1, 2 o 3 antígenos afines.

Estado de la proteína de unión antes de la unión a CD38	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
No unida previamente	9,02E+05	1,42E-03	1,57E-09
Unida previamente a CD3	8,35E+05	1,24E-03	1,48E-09
Unida previamente a CD28	7,39E+05	1,32E-03	1,79E-09
Unida previamente a CD3 después a CD28	8,18E+05	1,23E-03	1,50E-09
Unida previamente a CD28 después a CD3	8,37E+05	1,23E-03	1,47E-09

Estos resultados demuestran que las tres dianas pueden unirse a las proteínas de unión triespecíficas simultáneamente. La unión previa de las proteínas de unión triespecíficas con CD28, CD3 o ambos (en cualquier orden) no alteró la cinética de unión o la afinidad de unión a CD38.

A continuación, se evaluó cada dominio de unión a antígeno de la proteína de unión triespecífica CD38_{SB19}×CD28_{sup}×CD3_{mid} por SPR para determinar la capacidad de unirse al antígeno afín con y sin los otros dos dominios de unión a antígeno en saturación. Las tablas M3 y M4 muestran los resultados de estos ensayos.

Tabla M3. Unión a la diana sin otras dianas presentes

Diana	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

Tabla M4. Unión a la diana con otras dianas en saturación

Diana	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

Como se demuestra en las tablas M3 y M4, tener dos dianas saturadas por unión previa con antígeno no influyó en la cinética o afinidad de unión de la tercera diana por CD38 o CD28. En el caso de la unión a CD3, la unión previa a CD38 y/o CD28 dieron como resultado una cinética más rápida (impacto de aproximadamente 4 veces en los valores de k_{on} y k_{off}).

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se ensayaron en formato triespecífico con dos dominios de unión a antígeno anti-CD28 (superagonista, "sup" y agonista convencional, "cvn") y dos dominios de unión a antígeno anti-CD3 ("mid" y "low"). Las secuencias del dominio variable para estos dominios de unión a antígeno se proporcionan como sigue: anti-CD28_{sup}: SEQ ID NO: 49 (VH) y SEQ ID NO: 50 (VL); anti-CD28_{cvn}: SEQ ID NO: 51 (VH) y SEQ ID NO: 52 (VL); anti-CD3_{mid}: SEQ ID NO: 53 (VH) y SEQ ID NO: 54 (VL); anti-CD3_{low}: SEQ ID NO: 84 (VH) y SEQ ID NO: 85 (VL). Los resultados de los ensayos SPR que examinan la unión de proteínas de unión triespecíficas se muestran en la figura 5. Tres dominios de unión anti-CD38 tuvieron aproximadamente la misma afinidad de unión en el formato de proteína de unión triespecífica que en un formato monoespecífico. Ambos dominios de unión a CD3 tuvieron aproximadamente la misma afinidad de unión en formato mono-, bi- y triespecífico. Los dominios de unión a CD28 deben disminuir ligeramente (pero aún en intervalo nanomolar) la afinidad de unión en formato bi- o triespecífico en comparación con el monoespecífico. Cuando los otros dos dominios de unión a antígeno estaban saturados, los dominios de unión anti-CD38_{SB19} y anti-CD28_{sup} tenían afinidades de unión similares, en comparación con cuando los otros dos dominios de unión a antígeno no están unidos al antígeno. Sin embargo, el dominio de unión anti-CD3_{mid} mostró una cinética más rápida cuando los otros dos dominios de unión a antígeno estaban saturados. Estos resultados demuestran que los dominios de unión anti-CD38, anti-CD28 y anti-CD3 son compatibles para su uso con el formato de proteína de unión triespecífica.

Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 generados en este documento también se compararon con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 existente de mAb7 (véase SEQ ID NO: 47 para VH y SEQ ID NO: 48 para secuencias de VL, respectivamente). La unión de moléculas triespecíficas a CD38 expresado en la superficie de linfocitos murinos preB::300.19 recombinantes se determinó mediante citometría de flujo y los anticuerpos monovalentes anti-CD38 correspondientes se ensayaron en paralelo. La línea celular recombinante se describió por J. Deckket *et al.* 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Se recubrieron linfocitos murinos preB::300.19 que expresaban CD38 a 40 000 células/pocillo en una placa de alta unión de 96 pocillos (MSD L15XB-3) y se añadieron 100 µl/pocillo de moléculas triespecíficas durante 45 min a 4 °C y se lavaron tres veces con BSA al 1 % en PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; n.º 109-545-098) durante 45 min a 4 °C y se lavaron tres veces con BSA al 1 % en PBS. La unión del anticuerpo se evaluó después de centrifugación y resuspensión de las células añadiendo 200 µl/pocillo de BSA al 1 % en PBS y se leyó usando el sistema de citometría de flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron usando el programa informático BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Se usó citometría de flujo como se describe anteriormente para examinar la unión de mAb7 o la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb7 a linfocitos murinos pre-B que expresan polipéptido CD38 humano o de macaco cangrejero en su superficie celular. Como se muestra en la **figura 6A**, la proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{sup}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb7 unido a células que expresan CD38 humano (parte superior izquierda) con una afinidad aparente 8 veces menor que el anticuerpo monoespecífico mAb7 (parte superior derecha). Ni el anticuerpo monoespecífico mAb7 (parte inferior derecha) ni la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb7 (parte inferior izquierda) se unió a células que expresaban CD38 de macaco.

El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado mAb2 también se ensayó en formatos triespecíficos para la unión a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de macaco. Como se muestra en las **figuras 6B-6D**, y a diferencia de mAb7, las proteínas de unión triespecíficas CD38xCD28^{sup}xCD3^{mid} y CD38xCD28^{cvn}xCD3^{mid} con dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2, así como el anticuerpo monoespecífico mAb2, pudieron unirse a polipéptidos CD38 tanto humanos como de macaco cangrejero. La proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{cvn}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 9 veces menor que el anticuerpo mAb2 precursor (compárese la **figura 6C**, parte superior con la **figura 6D**, parte superior). La proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{cvn}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a células que expresaban CD38 de macaco con una afinidad aparente 7,5 veces menor que el anticuerpo mAb2 precursor (compárese la **figura 6C**, parte inferior con la **figura 6D**, parte inferior). La proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{sup}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 se unió a células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 2,5 veces menor que la proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{cvn}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb2 (compárese la **figura 6C**, parte superior con la **figura 6B**, parte superior).

El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado mAb6 también se comparó con el anticuerpo monoespecífico mAb6 para la unión a células que expresan polipéptidos CD38 humanos o de macaco. Mientras que el anticuerpo monoespecífico mAb6 se unió a células que expresan polipéptidos CD38 humanos (parte superior derecha) o de macaco cangrejero (parte inferior derecha) en el intervalo nM (**figura 6E**), la proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{sup}xCD3^{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 de mAb6 se unió a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos (parte superior izquierda) o de macaco cangrejero (parte inferior izquierda) sin saturación.

En conclusión, se encontró que la afinidad de unión de la proteína de unión triespecífica CD38s_{B19}xCD28^{sup}xCD3^{mid} a CD38 humano estaba en el mismo intervalo, ya fuera examinando la unión a CD38 humano recombinante por SPR o a CD38 humano expresado en una superficie celular mediante citometría de flujo (**figura 6F**). Asimismo, la afinidad de proteínas de unión triespecíficas CD38^{VH1}xCD28^{sup}xCD3^{mid/low} (dominio de unión anti-CD38 de mAb2) y CD38^{VH1}xCD28^{cvn}xCD3^{mid/low} (dominio de unión anti-CD38 de mAb2) para la unión a CD38 humano también estuvo en el mismo intervalo en ambos ensayos. Para CD38^{HHY1370}xCD28^{sup}xCD3^{mid} (dominio de unión anti-CD38 de mAb6), la K_D para la unión a CD38 humano se determinó por SPR en 1 nM, mientras que no pudo estimarse ningún valor preciso de CE50 por citometría de flujo. En la tabla M5 se proporciona un resumen de los valores de KD aparente (obtenidos por análisis FACS) de proteínas de unión triespecíficas con diversos dominios de unión anti-CD38.

Tabla M5. Resumen de los valores de KD aparente obtenidos por ensayos de citometría de flujo

	KD aparente por FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
Triespecífico con mAb2 anti-CD38	4,4 nM	7,5 nM
Triespecífico con mAb6 anti-CD38	Sin saturación	Sin saturación
Triespecífico con mAb7 anti-CD38	4 nM	Sin unión
	KD aparente por FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38

	KD aparente por FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
<i>mAb2</i>	0,5 nM	1 nM
<i>mAb6</i>	11,2 nM	6,6 nM
<i>mAb7</i>	0,5 nM	Sin unión

Como se esperaba, la proteína de unión trispecífica Δ CD38 \times CD28^{sup} \times CD3_{mid} que carecía del dominio de unión anti-CD38 no se unió a células que expresaban polipéptido CD38 humano o de macaco cangrejero (**figura 6G**). Esto indica que la unión observada en este ensayo fue específica para los dominios de unión a antígeno CD38.

Ejemplo 5: Caracterización *in vitro* e *in vivo* de proteínas de unión trispecíficas que contienen mAb2 anti-CD38 y mAb6 anti-CD38

El siguiente ejemplo describe experimentos que caracterizan la estabilidad, propiedades de unión y actividades de acopladores de linfocitos T novedosos que contienen dominios variables derivados de los anticuerpos mAb2 y mAb6. Se generaron anticuerpos anti-CD38 \times CD28 \times CD3 adicionales que comprenden variantes de los brazos anti-CD38, CD3 y CD28 de las proteínas de unión trispecíficas. Los nuevos anticuerpos anti-CD38/CD3/CD28 difieren en: 1) el dominio de unión anti-CD38 (mAb2 o mAb6); 2) el dominio de unión anti-CD3 (CD3_{high} o CD3_{low}; véanse SEQ ID NO: 84 y 85 para secuencias de VH y VL anti-CD3_{low}, respectivamente); 3) el dominio de unión anti-CD28 (CD28^{sup} o CD28_{cvn}). Dentro de posibles combinaciones, se diseñó, produjo y posteriormente se ensayó una colección de anti-CD38 \times CD28 \times CD3 para diversas funciones.

Materiales y métodos

Producción y purificación de proteínas de unión trispecíficas

Se produjeron proteínas de unión trispecíficas mediante transfección transitoria de 4 plásmidos de expresión en células Expi293 usando el kit de transfección ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se diluyó un 25 % (p/p) de cada plásmido en Opti-MEM, se mezcló con reactivo ExpiFectamine prediluido durante 20-30 minutos a temperatura ambiente (TA) y se añadió en células Expi293 (2,5 \times 10⁶ células/ml). A menudo se usó una optimización de la transfección para determinar la mejor relación de plásmidos para producir la proteína de unión trispecífica con buen rendimiento y pureza.

A los 4-5 días después de la transfección, el sobrenadante de las células transfectadas se recogió y se filtró a través de una unidad de filtro de 0,45 μ m (Nalgene). La proteína de unión trispecífica en el sobrenadante se purificó usando un procedimiento de 3 etapas. En primer lugar, se usó purificación por afinidad de proteína A y el Ab unido se eluyó usando "tampón de elución de IgG" (Thermo Fisher Scientific). En segundo lugar, se dializó el producto frente a PBS (pH 7,4) durante la noche con 2 cambios de tampón PBS. Cualquier precipitado se eliminó por filtración a través de una unidad de filtro de 0,45 μ m (Nalgene) antes de la siguiente etapa. En tercer lugar, se usó purificación por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Hiload 16/600 Superdex 200 pg, o Hiload 26/600 Superdex 200 pg, GE Healthcare) para retirar los agregados y diferentes especies en el preparado. Las fracciones se analizaron en SDS-PAGE reducido y no reducido para identificar las fracciones que contenían la proteína de unión trispecífica monomérica antes de combinarlas. El anticuerpo purificado se puede tomar en alícuotas y almacenar a -80 °C a largo plazo.

Ensayos de ELISA

Las propiedades de unión de los anticuerpos purificados se analizaron usando métodos de ELISA o SPR. Para ELISA, se usaron antígenos correspondientes para cada sitio de unión en la proteína de unión trispecífica para recubrir una Immuno Plate de 96 pocillos (Nunc 439454, Thermo Fisher Scientific) durante la noche a 4 °C usando 2 μ g/ml de cada antígeno en PBS (pH 7,4). La placa recubierta se bloqueó usando un 5 % de leche desnatada + 2 % de BSA en PBS durante una hora a TA, seguido de lavado con PBS + 0,25 % de Tween 20 tres veces (Aqua Max 400, Molecular Devices). Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos (Ab trispecíficos y de control) y se añadieron a las placas de ELISA (100 μ l/pocillo por duplicado), se incubaron a TA durante una hora, seguido de lavado 5 veces con PBS + 0,25 % de Tween 20.

Después de lavar, el Fab secundario antihumano conjugado con HRP (1:5000, cat. n.º 109-035-097, Jackson ImmunoResearch Inc) se añadió a cada pocillo y se incubó a TA durante 30 minutos. Después de lavar 5 veces con PBS + 0,25 % de Tween 20, se añadieron 100 μ l de sustrato de peroxidasa TMB Microwell (KPL, Gaithersburg, MD, EE. UU.) a cada pocillo. La reacción se terminó añadiendo 50 μ l de H₂SO₄ 1 M y se midió la DO₄₅₀ usando SpectraMax M5 (Molecular Devices) y se analizó usando el programa informático SoftMax Pro6.3 (Molecular Devices). Los datos finales se transfirieron al programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EE. UU.) y se representaron como se muestra. La CE50 se calculó usando el mismo programa informático.

Se usó ensayo de ELISA para determinar la unión de anticuerpos trispecíficos anti-CD38xCD28xCD3 o anticuerpo de control de isotipo (IgG4 humana) a CD3 humano (Cambridge Biologics LLC cat. n.º 03-01-0051), CD28 (Cambridge Biologics LLC cat. n.º 03-01-0303) y CD38 (Cambridge Biologics LLC cat. n.º 03-01-0369). Los anticuerpos unidos se detectaron usando un anticuerpo secundario anti-Fab conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc n.º 109-035-097).

Ensayo de destrucción celular *in vitro*

Se usaron PBMC humanos purificados para ensayos de destrucción *in vitro* contra diversas células cancerosas usando diferentes proteínas de unión trispecíficas. En resumen, el ensayo de destrucción se estableció en una placa de 96 pocillos de fondo en V. Para cada placa, se sembraron 40 ml de PBMC de cada donador a 2×10^6 células/ml, y se prepararon 30 ml de células diana marcadas con PKH26 (Sigma n.º MINI26) a $2,5 \times 10^5$ células/ml (4 µl de tinte para teñir hasta 1×10^7 células). Primero se añadieron 20 µl/pocillo de proteínas de ensayo a diversas concentraciones o PMA en cada pocillo, seguido de la adición de 80 µl/pocillo de células diana marcadas en cada pocillo (2×10^4 células/pocillo). A continuación, se añadieron 100 µl de PBMC a cada pocillo, alcanzando E:T = 10:1 por pocillo (2×10^5 células/pocillo), y se incubaron durante 24 horas a una estufa de incubación a 37 °C y un 5 % de CO₂. Las células se centrifugaron, y el sobrenadante se recogió para medir la liberación de citocinas, o se desechó. Las células se tiñeron con tampón de tinción de células muertas Vivid LIVE/DEAD™ Fixable Violet (Life Technologies n.º L34955) (el tampón de tinción se preparó añadiendo 60 µl de reactivo Vivid en 60 ml de PBS). Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de tinción por incubación durante 15 min a TA en la oscuridad. Después de lavar las células con PBS 1x, las células se resuspendieron en 200 µl de PBS con un 0,5 % de paraformaldehído, y las células cancerosas PKH26+Vivid+ se recogieron mediante citómetro de flujo Fortessa (Beckton Dickinson, San Jose, CA), seguido de análisis usando el programa informático Flowjo. El porcentaje de destrucción se calcula como destrucción específica-destrucción espontánea/células totales y se representa como se muestra.

Ensayo de liberación de citocinas

Para medir las concentraciones de citocinas inflamatorias en los ensayos de activación *in vitro*, ensayos de destrucción *in vitro*, ensayos de activación *in vivo* en ratones NSG humanizados con células de cordón umbilical CD34+ y el estudio de toxicidad, se recogió el sobrenadante de cultivo celular y se diluyeron muestras de suero de acuerdo con el protocolo del fabricante usando el kit Milliplex Human High Sensitivity T cell 13-plex (EMD Millipore). Estas se analizaron posteriormente por el sistema EMD Millipore MAGPIX® y el programa informático MILLIPLEX® Analyst 5.1.

Modelos de ratón *in vivo* y estudios de eficacia

Se usaron ratones NSG injertados con células madre hematopoyéticas CD34+ humanas (hu-CD34) como modelo de ratón *in vivo*. Estos ratones desarrollan inmunocitos humanos multilíneaje y son una plataforma validada para estudios de eficacia de inmunooncología (véase, por ejemplo, Shultz, L.D. *et al.* (2014) Cold Spring Harb. Protoc. 2014:694-708). Se producen ratones NSG hu-CD34+ inyectando células madre hematopoyéticas CD34+, que muestran injerto multilíneaje eficaz de poblaciones de inmunocitos humanos que incluyen linfocitos T, linfocitos B y algunas otras poblaciones (McDermott, S.P. *et al.* (2010) Blood 116:193-200). La hematopoyesis multilíneaje ocurre en 12 semanas. El injerto es estable durante más de un año sin enfermedad de injerto contra hospedador.

Para el estudio de eficacia usando ratones NSG hu-CD34, se adquirieron ratones de The Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.) y se validaron poblaciones de células humanas antes de su uso. En general, se usaron 5×10^6 células tumorales mezcladas en Matrigel (BD Biosciences) (50 % v/v) para inocular el tumor en cada ratón. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 100-150 mm³, los ratones se seleccionaron y aleatorizaron en cada grupo para el estudio. Se administraron anticuerpos por vía intravenosa a dosis dadas 3 veces a la semana. Se supervisó el peso corporal 1-3 veces a la semana. Se midió el tamaño del tumor por mediciones de tumor con compás calibrador 1-3 veces/semana. Todos los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor alcanzó 1500 mm³, o 24 horas después de la última dosis. Se recogieron muestras terminales de sangre (0,3 ml) en tubos separadores de suero, se mezclaron invirtiendo suavemente cinco veces y se pusieron en una gradilla para tubos. También se recogieron los tumores terminales y se pesaron antes de ponerlos en fijador para el análisis de inmunohistoquímica.

Se usaron ratones NSG humanizados con PBMC humanos (hu-PBMC) como otro modelo de ratón *in vivo*. Estos ratones se producen inyectando PBMC humanos purificados de donadores sanos, que tienen la tasa de injerto más rápida usando leucocitos monomorfonucleares de la sangre periférica adultos y permiten estudios a corto plazo que requieren una fuerte función efectora y de linfocitos T de memoria y linfocitos NK, y son adecuados para estudio de eficacia a corto plazo (3-4 semanas) debido a la enfermedad de injerto contra hospedador.

Para el estudio de eficacia usando ratones NSG hu-PBMC, ratones NSG de 8-10 semanas de edad (cat. n.º 005557, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) se adquirieron de The Jackson Laboratory (Maine, EE. UU.). Cada ratón se inoculó con 5×10^6 células tumorales mezcladas en Matrigel (BD Biosciences) (50 % v/v) por vía subcutánea. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 50-100 mm³, se reconstituyeron 10×10^6 PBMC humanos de donadores sanos en cada ratón por vía intraperitoneal (IP). La reconstitución de células humanas se validó al día siguiente. Una vez que el tamaño del tumor alcanzó el intervalo de 100-150 mm³, los ratones se seleccionaron y

aleatorizaron en cada grupo para el estudio. Se administraron anticuerpos por vía intravenosa a dosis dadas 3 veces a la semana. Se supervisó el peso corporal 1-3 veces a la semana. Se midió el tamaño del tumor por mediciones de tumor con calibre 1-3 veces/semana. Todos los ratones se sacrificaron cuando el tamaño del tumor alcanzó 1500 mm³ o 24 horas después de la última dosis. Se recogieron muestras terminales de sangre (0,3 ml) en tubos separadores de suero, se mezclaron invirtiendo suavemente cinco veces y se pusieron en una gradilla para tubos. También se recogieron los tumores terminales y se pesaron antes de ponerlos en fijador para el análisis de inmunohistoquímica.

Para el modelo de ratón NSG hu-PMBC diseminado, se inyectaron $1-5 \times 10^6$ células en cada ratón por vía intravenosa en el día 0. En el día 3, se tomaron imágenes de luminosidad basal para la aleatorización. En el día 4, se reconstituyeron 10×10^6 PBMC humanos de donadores sanos en cada ratón por vía intraperitoneal (IP). Los ratones se trataron semanalmente en el día 5, 12, 19 usando las dosis indicadas. Se tomaron imágenes corporales de luminosidad semanales el día 10, 17, 24 para supervisar el volumen del tumor en cada animal. Al finalizar el estudio, se recogieron sangre, bazo, hueso y médula ósea para el estudio de histopatología.

Resultados

La capacidad de los anticuerpos de unirse a los tres antígenos diana se ensayó mediante ensayo ELISA. IgG4 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} mostraron una afinidad de unión similar a CD3 y CD38 humano y de mono, pero afinidad de unión variable a CD28 (humano y de mono tienen dominio extracelular idéntico) mostrando CD28^{sup} una mejor afinidad (**figura 7A**). La variante de IgG4 FALA CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} y CD38^{HHY1370}×CD28^{sup}×CD3^{mid} y las variantes LALA P329A de IgG1 y NNA mostraron una unión similar a CD3, CD28 y CD38 humanos (**figura 7B**).

A continuación, se ensayaron las variantes de la proteína de unión trispecífica anti-CD38×CD3×CD28 para determinar su capacidad de inducir la activación de linfocitos T y la destrucción de células tumorales mediada por anticuerpos (**figura 8A-8D**). La **figura 8A** muestra las actividades de destrucción *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 la línea celular de mieloma múltiple humano RPMI-8226 usando PBMC de 3 donadores diferentes a E:T = 10. La CE50 de la actividad de destrucción se calculó y resumió en la tabla N. Ambas proteínas de unión trispecíficas anti-CD38×CD3×CD28 que contenían CD28^{sup} mostraron mejores actividades de destrucción. Las actividades de destrucción *in vitro* de estas moléculas también se examinaron usando líneas celulares NCI-H929 (**figura 8B**), KMS-26 (**figura 8C**) y KMS-11 (**figura 8D**).

Proteínas de unión trispecíficas anti-CD38×anti-CD3×anti-CD28 con variantes de IgG1 LALA P329A y NNA, o variante de IgG4 FALA, también mostraron destrucción *in vitro* de células KMS-11 de mieloma múltiple (**figura 8E**) y U266 (**figura 8F**). La CE50 para cada anticuerpo contra cada línea celular se calculó y resumió en la tabla Q2 (KMS-11) y Q3 (U266).

Las **figuras 9A, 9B y 10** muestran el perfil de activación de linfocitos T *in vitro* de IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} e IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{low}. Ambos anticuerpos mostraron actividades de activación similares para linfocitos T CD4 y CD8. La CE50 para cada anticuerpo contra cada línea celular se calculó y resumió en la tabla N (RPMI-8226), tabla O (NCI-H929), tabla P (KMS-26) y la tabla Q (KMS-11).

Tabla N: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células RPMI8266 CD38+ por PBMC de diferentes donadores

Anticuerpo	CE50 (ng/ml)		
	Donador n.º 65	Donador n.º 67	Donador n.º 68
IgG4 CD38 ^{VH1} ×CD28 ^{sup} ×CD3 ^{mid}	5,30	1,95	3,3
IgG4 CD38 ^{HHY1370} ×CD28 ^{sup} ×CD3 ^{mid}	2,24	3,42	3,4
IgG4 CD38 ^{VH1} ×CD28 ^{cvn} ×CD3 ^{mid}	8,31	29,52	46,8
IgG4 CD38 ^{HHY1370} ×CD28 ^{cvn} ×CD3 ^{mid}	4,62	8,98	16,5

Tabla O: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células NCI-H929 CD38+ por PBMC de diferentes donadores

	CE50 (ng/ml)		
	Donador n.º 65	Donador n.º 67	Donador n.º 68
IgG4 CD38 ^{VH1} ×CD28 ^{sup} ×CD3 ^{mid}	0,51	0,48	0,9
IgG4 CD38 ^{HHY1370} ×CD28 ^{sup} ×CD3 ^{mid}	0,94	1,84	2,5

	CE50 (ng/ml)		
	Donador n.º 65	Donador n.º 67	Donador n.º 68
IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	3,70	9,47	10,4
IgG4 CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	2,31	6,39	7,2

Tabla P: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células KMS-26 CD38+ por PBMC de diferentes donadores

	CE50 (ng/ml)		
	Donador n.º 65	Donador n.º 67	Donador n.º 68
IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}	1,03	0,91	1,3
IgG4 CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}	3,95	5,06	5,3
IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	10,73	28,17	22,4
IgG4 CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	15,84	32,10	25,7

Tabla Q: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células KMS-11 CD38+ por PBMC de diferentes donadores

	CE50 (ng/ml)		
	Donador n.º 65	Donador n.º 67	Donador n.º 68
IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}	3,05	3,40	14,7
IgG4 CD38_{hhy1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}	4,17	7,74	25,1
IgG4 CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	18,14	98,83	566,8
IgG4 CD38_{hhy1370}xCD28_{cvn}xCD3_{mid}	16,30	27,63	139,2

Tabla Q2: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células KMS-11 CD38+ por PBMC de diferentes donadores (variante Fes de IgG1/4)

CE50	CD38 _{VH}	CD38 _{VH1}	CD38 _{VH1}	CD38 _{hhy1370}	CD38 _{hhy1370}	CD38 _{hhy1370}
(pM)	xCD28 _s	xCD28 _{sup}	xCD28 _{sup}	CD28 _{sup} xCD	CD28 _{sup} xCD	CD28 _{sup} xCD
(KMS11)	upxCD3	xCD3 _{mid}	xCD3 _{mid}	3 _{mi}	3 _{mi}	3 _{mi}
	mid IgG4	IgG1	IgG1	IgG4 FALA	IgG1 LALA	IgG1 NNAS
	FALA	LALA	NNAS		P329A	
		P329A				
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

Tabla Q3: Destrucción específica mediada por anticuerpos de células U266 CD38+ por PBMC de diferentes donadores (variante Fes de IgG1/4)

CE50	CD38 _{VH}	CD38 _{VH1} X	CD38 _{VH1} X	CD38 _{hhy1370}	CD38 _{hhy1370}	CD38 _{hhy1370}
(pM)	xCD28 _s	CD28 _{sup} xC	CD28 _{sup} xC	xCD28 _{sup} xC	xCD28 _{sup} xPXC	xCD28 _{sup} xC
(U266)	upxCD3	D3 _{mid}	D3 _{mid}	D3 _{mi}	D3 _{mi}	D3 _{mi}
	mid IgG4	IgG1 LALA	IgG1 NNAS	IgG4 FALA	IgG1 LALA	IgG1 NNAS
	FALA	P329A			P329A	
KP509 01	1,879	1,031	1,150	2,691	1,597	2,816
KP509 04	0,8657	3,570	2,018	2,112	0,8375	3,527

También se examinó la producción de citocinas inducida por las variantes de proteína de unión trispecífica (**figuras 11A y 11B**) usando el método descrito en Stebbings, R. *et al.* (2007) (J. Immunol. 179:3325-3331) recubriendo la placa con los anticuerpos indicados, seguido de incubación con PBMC humanos durante 24 horas usando 2 concentraciones de los anticuerpos de ensayo (5 µg/ml y 25 ng/ml). Se recogieron sobrenadantes de cultivo de 24 horas y se usaron para medir la concentración de IL2, IL6, IL10, IL12 y TNF-α, IFN-γ en los sobrenadantes como se describe anteriormente. IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid}, IgG4 CD38^{hh1370}×CD28^{sup}×CD3^{mid}, IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{cvn}×CD3^{mid}, IgG4 CD38^{hh1370}×CD28^{cvn}×CD3^{mid} estimularon todas la producción de un nivel significativo de IL2, TNF-α e IFN-γ a 5 µg/ml, pero no lograron inducir un nivel medible de ninguna citocina a 25 ng/ml, una dosis que muestra eficacia *in vivo* en 2 modelos de ratón NSG humanizados.

La actividad antitumoral se ensayó *in vivo* en modelos de ratón para las variantes de proteína de unión trispecífica (**figuras 12A-13F**) como se describe anteriormente. Las **figuras 12A-12E** muestran los resultados del estudio de eficacia *in vivo* usando el modelo de ratón NSG injertado con células madre hematopoyéticas CD34⁺ humanas (hu-CD34) al que se ha implantado la línea celular de MM humano RPMI-8226. Se usaron IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} y anticuerpos biespecíficos CD38×CD3 de control de referencia para tratar a ratones portadores de tumor a las dosis indicadas 3QW (6 dosis en total). Se midió y representó el peso corporal y el crecimiento del tumor para cada ratón (**figura 12A y 12E**). También se representó la curva del crecimiento promedio del tumor (**figura 12D**), el volumen del tumor del día 18 (**figura 12B**) y el peso del tumor terminal D19 (**figura 12C**) para cada grupo. Todos los grupos tratados con IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} no solo mostraron eficacia estadística en comparación con el control de PBS, sino que también mostraron eficacia estadísticamente mejor a dosis de 1 µg/kg en comparación con el anticuerpo biespecífico CD38×CD3 de control.

Las **figuras 13A-13F** muestran los resultados del estudio de eficacia *in vivo* usando el modelo de ratón NSG humanizado con PBMC humanos al que se ha implantado la línea celular de MM humano RPMI-8226. Se usaron IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} y anticuerpos biespecíficos CD38×CD3 de control de referencia para tratar a ratones portadores de tumor a las dosis indicadas 3QW (8 dosis en total). Se midió y representó el crecimiento del tumor para cada ratón (**figura 13A**). Se representó la curva de crecimiento promedio del tumor (**figura 13F**), el volumen del tumor del día 4 (día de inicio del tratamiento; **figura 13B**), el volumen del tumor del día 21 (día del último tratamiento; **figura 13C**), el volumen promedio del tumor del día 21 (**figura 13D**) y el peso del tumor terminal del día 22 (**figura 13E**) para cada grupo. Todos los grupos tratados con IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} no solo mostraron eficacia estadística en comparación con el control de PBS, sino que también mostraron eficacia estadísticamente mejor a múltiples dosis en comparación con el anticuerpo biespecífico CD38×CD3 de control, lo que indica actividad antitumoral *in vivo* superior por el anticuerpo trispecífico anti-CD38/CD3/CD28.

El anticuerpo biespecífico CD38×CD3 de control de referencia comprendía las siguientes secuencias:
SEQ ID NO 108: la cadena pesada 1 de referencia (se une a CD38)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVSEINPQSS
TINYATSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYGNWFPYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSDTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

SEQ ID NO 109: la cadena pesada 2 de referencia (se une a CD3)

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKY
NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVS
WFAYWGQGTLVTVSSGKPGSGKPGSGKPGSGKPGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT
CGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTIS
GAQPEDEADYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLEPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

SEQ ID NO 110: la cadena ligera de referencia (se une a CD38)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNVDTWVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS
 VPDRFTGSGSGTDFLTITSLQPEDEATYFCQQYDSYPLTFGGGTKLEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 6: Estudio de aumento de dosis con proteínas de unión trispecíficas que contienen mAb2 y mAb6 anti-CD38

Materiales y métodos

Todos los estudios de NHP se llevaron a cabo por Covance (Princeton, New Jersey, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo ICUCA de Covance. Se usaron macacos cangrejeros macho sin tratamiento previo con fármaco y proteína o sin tratamiento previo con proteína en todos los estudios. En función del diseño del estudio, se seleccionaron monos y se agruparon para cada proteína de unión trispecífica. El anticuerpo se administró por infusión intravenosa durante 1 hora por la vena safena. Se administraron dosis crecientes en días consecutivos para dosis bajas (<10 µg/kg), pero con un intervalo de 1-2 días para dosis más altas (>10 µg/kg) con propósitos de observación. Se recogieron muestras de sangre a 0 horas (día 1 solo), 0,5 horas (medio de la infusión), 1 y 6 horas desde el inicio de la infusión para todos los animales después de cada dosis, según se especifica. Se recogieron muestras de sangre no programadas adicionales a criterio del director del estudio, el anatomopatólogo y/o veterinario clínico. Se devolvieron todos los animales a la colonia en el día 60. Se prepararon PBMC y suero de las muestras de sangre usando métodos convencionales, y se conservaron para análisis futuro.

La sangre de primates no humanos tratados se tiñó con anticuerpos conjugados con fluorescencia contra marcadores de linfocitos T e IgG humana, fragmento Fcγ, y se analizó en un citómetro de flujo.

Resultados

Se llevó a cabo un estudio de toxicidad de aumento de dosis usando proteínas de unión trispecíficas IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{sup}XCD3^{mid} que contiene mAb2, IgG4 CD38^{hhyl370}XCD28^{sup}XCD3^{mid} que contiene mAb6, IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{cvn}XCD3^{mid} que contiene mAb2 e IgG4 CD38^{hhyl370}XCD28^{cvn}XCD3^{mid} que contiene mAb6 en primates no humanos. Los tres dominios de unión en 4 proteínas de unión tienen reactividad cruzada con polipéptidos CD38/CD3/CD28 de macaco. El estudio se ideó para evaluar el posible perfil de toxicidad de la molécula. Se recogieron muestras de sangre para aislamientos de suero y PBMC. Se investigaron poblaciones de linfocitos T circulantes después de cada dosis (**figura 14E-14H**), junto con la activación de la subpoblación de linfocitos T (CD69+) (**figuras 14A-14D**). El porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 en circulación disminuyó con el aumento de la dosis. La activación significativa de linfocitos T CD4 y CD8 fue prominente a partir de dosis de 2,5 µg/kg, lo que sugiere una potente capacidad de activación para moléculas que contienen mAb2 y mAb6. Se observó una eliminación significativa de linfocitos T circulantes con todas las proteínas a 12,5 µg/kg (**figuras 14I-14L**), que se correlaciona de nuevo con la potencia. La reducción de linfocitos T circulantes fue bastante transitoria, volviendo al nivel previo al tratamiento después de 24-48 horas (**figuras 14M-14P**). También se midió el nivel en suero de varias citocinas. Se observó liberación significativa de IL-6 e IL-10 a 12,5 µg/kg con todas las moléculas, que fue bastante transitoria, volviendo al nivel basal a las 24 horas (**figura 14U**).

IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{sup}XCD3^{mid} (**figura 14V**) e IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{cvn}XCD3^{mid} (**figura 14W**) indujeron ambas la reducción de linfocitos T en sangre a dosis más altas. Asimismo, IgG4 CD38^{hhyl370}XCD28^{sup}XCD3^{mid} (**figura 14X**) e IgG4 CD38^{hhyl370}XCD28^{cvn}XCD3^{mid} (**figura 14Y**) indujeron también la reducción de linfocitos T en sangre a dosis más altas. Sin embargo, los linfocitos T comenzaron a reaparecer en la sangre 24 horas después del tratamiento con cualquiera de las cuatro proteínas de unión trispecíficas (**figuras 14Z-14AC**). Las **figuras 14AD** y **14AE** muestran la cantidad de IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{sup}XCD3^{mid} unida a linfocitos T CD4+ después de la administración de una dosis de 100 µg/kg. Las **figuras 14AF** y **14AG** muestran la cantidad de IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{sup}XCD3^{mid} unida a linfocitos T CD8+ después de la administración de una dosis de 100 µg/kg. Estos datos demostraron claramente que el Ab trispecífico IgG4 CD38^{VH1}XCD28^{sup}XCD3^{mid} puede unirse a linfocitos T *in vivo* con tiempo prolongado (48-72 horas).

Ejemplo 7: Optimización de la farmacocinética/farmacodinámica mediante variantes de Fc

Materiales y métodos

Se capturaron en un chip Biacore Fcγ RI humano recombinante marcado con 6-His en el extremo C (R&D Systems n.º 1257-Fc-050), Fcγ RIIA humano recombinante marcado con 10-His en el extremo C (R&D Systems n.º 1330-CD-050/CF) y Fcγ RIII humano recombinante (V158 o F158) marcado con HPC4 en el extremo C. Se inyectaron anticuerpos a 200, 100 y 50 nM durante 2 min, seguido 2 min de disociación en tampón HBS-P+, CaCl₂ 2 mM pH 7,4 a caudal de 30 µl/min usando Biacore 200. Se mostró la curva de unión a 200 nM.

Se usó ensayo ELISA usando receptor de Fc neonatal humano recombinante marcado con HPC4 en el extremo C (FcRn) para medir las propiedades de unión de las proteínas de unión trispecíficas con diferentes modificaciones de

Fc. En resumen, se usó receptor de Fc neonatal humano recombinante (FcRn) para recubrir la placa de ELISA (Nunc 80040LE) (2 ug/ml en PBS) durante la noche. Se añadieron proteínas de unión trispecíficas diluidas en serie con diferentes modificaciones de Fc en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, seguido de lavado e incubación con anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con HRP.

Resultados

A continuación, se ensayaron variantes de proteínas de unión trispecíficas descritas anteriormente para la unión a diversos receptores de Fc para optimizar la farmacocinética (PK)/farmacodinámica (PD).

Las variantes de Fc humanas se caracterizaron por la unión a FcγR I (**figura 15A**), FcγR IIa (**figura 15B**) y FcγR IIb/c (**figura 15C**) como se describe anteriormente. Las variantes ensayadas fueron IgG1 humana, IgG4 humana e IgG4 humana con mutaciones FALA (F234A y L235A de acuerdo con el índice EU) con una proteína de unión trispecífica de control.

Como se muestra en las **figuras 15A-15C**, IgG1 e IgG4 naturales pudieron unirse a FcγR I y FcγR IIa, pero no a FcγR IIb/c, como se presentó previamente. Las mutaciones de IgG4 FALA eliminaron la unión a FcγR I y FcγR IIa. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que eliminar la unión a FcγR I y FcγR IIa puede mejorar la PK/PD al eliminar la agrupación no intencionada a través de interacciones de Fc/FcγR.

A continuación, se examinó la variante de IgG4 FALA para determinar la unión a FcRn. La variante, así como la IgG4 natural, se unió a FcRn (**figura 16**). Estos resultados demuestran que las mutaciones de IgG4 FALA no afectan las interacciones entre el Fc de IgG4 y el FcRn, lo que implica un impacto mínimo en la semivida de la proteína de unión.

Los parámetros PK de IgG4 CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid},

IgG4 FALA CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid}, IgG1 LALA P329A CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} e IgG4 FALA CD38^{HHY1370}×CD28^{sup}×CD3^{mid}, como se determina en ratones NSG, se resumen en la **figura 17**. Las modificaciones de Fc de IgG4 mostraron una semivida y ABC significativamente mejoradas en ratones NSG al eliminar la unión a FcγRI específica de NSG, que es abundante en macrófagos.

Ejemplo 8: Activación *in vitro* y eficacia antitumoral *in vivo* de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38

Materiales y métodos

Liberación de citocinas desde PBMC humanos

Se incubaron PMBC humanos con 100 pM de proteínas de unión durante 24 h. Se recogieron los sobrenadantes y se midieron las citocinas mediante Luminex usando placas Drop Array (por triplicado). Para experimentos con células diana tumorales, se incubaron PMBC humanos con 100 pM de anticuerpos y con o sin células diana RPMI-8226 a una relación de E:T de 10:1 durante 24 h. Los sobrenadantes se recogieron después de que los PMBC se incubaran con proteínas trispecíficas y se ensayaron para detectar citocinas con el kit MAP MILLIPLEX® y se analizaron en un sistema MAGPIX®.

Ensayo de Bcl-xL

Los linfocitos T clasificados negativamente a partir de PBMC (magnéticos) se incubaron con Ab unidos a placa 100 nM durante 1 día. A continuación, los linfocitos T se lavaron y se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorescencia específicos para marcadores de linfocitos T y Bcl-xL y se analizaron en un citómetro de flujo.

Proliferación de linfocitos T

Los linfocitos T clasificados negativamente a partir de PBMC (separación celular en microesferas magnéticas) se incubaron con Ab unidos a placa (100 nM) durante 1 a 6 días. Las células totales se contaron por citometría de flujo usando recuento de microesferas en días específicos después del inicio de la incubación. El factor de cambio se calculó a partir de los recuentos de células del día 0 (500 células/ul). Resultados de 3 donadores de PBMC.

Expresión de IL-2

Se incubaron células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ con proteínas trispecíficas durante 6 horas, luego se usó el sistema de ensayo de luciferasa Bio-Glo™ para detectar la expresión del gen indicador de luciferasa.

Activación PBMC *in vitro*

Se determinó la activación (CD69⁺) de células PBMC humanas tratadas con anticuerpos trispecíficos anti-CD38×CD28×CD3 o proteína de unión IgG4 de control.

Eficacia *in vivo* en el modelo de tumor diseminado

Para el modelo de ratón NSG hu-PMBC diseminado, se inyectaron $1-5 \times 10^6$ células en cada ratón por vía intravenosa en el día 0. En el día 3, se tomaron imágenes de luminosidad basal para la aleatorización. En el día 4, se reconstituyeron 10×10^6 PBMC humanos de donadores sanos en cada ratón por vía intraperitoneal (IP). Los ratones se trataron semanalmente en el día 5, 12, 19 usando las dosis indicadas. Se tomaron imágenes corporales de luminosidad semanales el día 10, 17, 24 para supervisar el volumen del tumor en cada animal. Al finalizar el estudio, se recogieron sangre, bazo, hueso y médula ósea para el estudio de histopatología.

Resultados

Las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 que contienen mAb2 con la región Fc variante de IgG4 FALA provocaron niveles marcadamente reducidos de liberación no específica de IFN- γ en PBMC humanos, en comparación con proteínas de unión similares con regiones Fc naturales (**figura 18A**). Se observaron resultados similares con la liberación de IL-2 (**figura 18B**) y TNF- α (**figura 18C**). Es importante destacar que la liberación de citocinas fue significativamente menor para estas proteínas de unión trispecíficas variantes de Fc que para el anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia. Estos resultados implican un perfil de seguridad mejorado de proteínas de unión trispecíficas con variantes de Fc debido a una reducción en la liberación de citocinas no específicas.

Las variantes de Fc de IgG1 e IgG4 tanto de CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} que contiene mAb2 como de CD38_{HH71370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} que contiene mAb6 también dieron lugar a la activación *in vitro* de PBMC humanos (**figura 18D**).

Se requiere coestimulación inmunitaria por ligamiento de CD28 para la supervivencia y proliferación de linfocitos T; la señalización TCR sola no provoca la proliferación de linfocitos T (Sharmee y Allison (2015) Science 348:56-61). La proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} dio lugar a la inducción de Bcl-xL en linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, mientras que la eliminación de los dominios de unión a antígeno CD28 o CD3 eliminó este efecto (**figuras 19A y 19B**). Estos resultados demuestran, como se esperaba, que se requieren ambos brazos de unión a CD3 y CD28 para la inducción de Bcl-xL en linfocitos T por las proteínas de unión trispecíficas anti-CD38, proporcionando de este modo una señal de prosupervivencia a los linfocitos T. El brazo anti-CD28 de la proteína de unión trispecífica es crucial para la regulación por aumento de Bcl-xL prosupervivencia en linfocitos T. Cuando se compara con un anticuerpo biespecífico anti-CD38xanti-CD3 de referencia, la proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}xCD28xCD3 dio lugar a una mayor regulación por aumento de Bcl-xL en linfocitos T CD4+ y CD8+ (**figuras 19C y 19D**).

Para determinar el impulsor principal de la activación de linfocitos T por proteínas de unión trispecíficas CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid}, se usó la expresión de IL-2 en una línea Jurkat indicadora de linfocitos T que contenía un promotor de IL2 humana que impulsa el indicador de luciferasa para medir la activación. La mutación de inactivación del dominio de unión anti-CD3 dio lugar a la eliminación de la activación de linfocitos T, lo que demuestra que la activación de linfocitos T es un efecto específico del ligamiento de CD3 (**figura 19E**). Estos resultados muestran que anti-CD3 es el impulsor principal de la activación de linfocitos T por proteínas de unión trispecíficas, y que anti-CD28 también contribuye significativamente a la señal de activación de linfocitos T. El impulsor principal de la liberación de citocinas se examinó también usando PBMC humanos (**figura 19F**). Al examinar la liberación de TNF, IFN γ , IL-2, IL-6 e IL-10, se encontró que CD3 es el determinante principal de la liberación de citocinas. Se encontró que CD28 tenía la menor contribución. También se encontró que las proteínas de unión trispecíficas con anti-CD38_{VH1} inducen menos liberación de citocinas que el comparador de referencia.

También se examinó la proliferación de linfocitos T. La activación de linfocitos T usando proteína de unión trispecífica anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 con Fc variante de IgG4 FALA dio lugar a una mayor proliferación que el control de referencia o de isotipo (**figura 19G**). Esta activación se redujo tras la mutación de los dominios de unión a antígeno anti-CD28 o anti-CD3 (**figura 20**).

El modelo de ratón NSG humanizado se usó a continuación para experimentos de crecimiento de tumores sólidos *in vivo*. A los ratones se les implantó en la semana 6-8 células de mieloma humano RPMI8226. En la semana 9, se introdujeron PBMC humanos por inyección ip, se reconstituyeron los hPBMC y se administró tratamiento antitumoral en las semanas 10-13. Se implantó a 56 ratones hembra NSG humanizados con PBMC 5 millones de células RPMI8226 en Matrigel al 50 %, y se seleccionaron los ratones y se aleatorizaron en el estudio en el día 5 o 6 después del implante. Este modelo sirve como modelo de tumor *in vivo* en ratones con linfocitos T maduros humanos.

También se ensayaron proteínas de unión trispecíficas en un modelo de ratón NSG de crecimiento tumoral diseminado, usando células de mieloma humano NCI-H929-Luc y ensayando el crecimiento del tumor por bioluminiscencia. La proteína de unión trispecífica CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid} con variante de Fc de IgG4 FALA mostró una eficacia antitumoral dependiente de la dosis estadísticamente significativa en este modelo de tumor diseminado a 30 $\mu\text{g/kg}$ (**figura 21**). La proteína de unión trispecífica CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} con variante de Fc de IgG4 FALA

también mostró una eficacia antitumoral dependiente de la dosis estadísticamente significativa en este modelo de tumor diseminado a 30 µg/kg y 10 µg/kg (**figura 22**).

Las proteínas de unión triespecíficas IgG4 FALA CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} que contiene mAb2 e IgG4 FALA CD38^{hhy1370}×CD28^{sup}×CD3^{mid} que contiene mAb6 mostraron potentes actividades de destrucción tumoral *in vitro* contra células de mieloma NCI-H929-Luc usando PBMC humanos de dos ratones NSG humanizados donadores (**figura 23A** y **23B**). La proteína de unión triespecífica IgG4 FALA CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid} mostró actividad tumoral *in vivo* superior, en comparación con el anticuerpo biespecífico de referencia, en el modelo de tumor diseminado (**figura 23C**). Los valores de p de comparación con el control de vehículo (PBS) se determinaron como sigue:

IgG4 FALA CD38^{VH1}×CD28^{sup}×CD3^{mid}: p = 0,0023; IgG4 FALA CD38^{HHY1370}×CD28^{sup}×CD3^{mid}: p = 0,0088; CD38×CD3 Fab-scFv-Fc biespecífico de referencia: p = 0,6045.

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran un candidato anti-CD38 mejorado con región Fc variante que muestra semivida aumentada, liberación reducida de citocinas no específicas y mayor eficacia antitumoral *in vivo*.

Ejemplo 9: Caracterización adicional de proteínas de unión triespecíficas anti-CD38

Se requieren dos señales para estimular a los linfocitos T para una función efectora óptima y una proliferación mantenida. La activación mediada por el complejo del receptor de linfocitos T (TCR)-CD3 induce activación transcripcional que da lugar a la secreción de citocinas. El acoplamiento de una segunda proteína de membrana superficial, CD28, estimula una vía de transducción de señales alternativa e inhibe la muerte celular programada (Esensten JH, Helou YA, *et al.* Immunity 44:973-88(2016); Hui E, Cheung J, *et al.* Science 355:1428-1433 (2017)). En ausencia de una segunda señal, la estimulación de linfocitos T a través de CD3 solo normalmente da lugar a muerte celular inducida por activación (Chai JG, Lechler RI. Int Immunol. 9:935-44(1997)). Se planteó la hipótesis de que la proliferación de linfocitos T podría aumentarse combinando especificidades contra estas dos dianas diferentes.

La **figura 24A** muestra un ensayo indicador de luciferasa que se llevó a cabo usando células Jurkat IL2-luc2P GloResponse™ (Promega) después de estimulación por CD38^{VH1}/CD28^{sup}×CD3^{mid} y sus mutantes KO de un solo sitio de unión y KO triple a concentración de 10 nM. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la estimulación de linfocitos T (por ejemplo, señalización NFAT).

Usando el formato de Ab biespecífico de variable doble cruzada (CODV) (Steinmetz A, *et al.* MAbs 8: 867-878(2016)), se evaluaron combinaciones de Fv de α-CD3ε (señal 1) y α-CD28 (señal 2) para determinar si el acoplamiento doble de estas moléculas de superficie celular podría estimular y mantener la activación de linfocitos T (**figura 24B**). Se usó un Ab anti-CD3ε de afinidad media (K_D ~20 nM) para evitar la estimulación del receptor de linfocitos T de alta afinidad que provoca la liberación de citocinas de alto nivel y aumenta el riesgo de síndrome de liberación de citocinas. Este agonista de CD3 se ensayó en ambas posiciones del brazo doble en combinación con un Ab contra CD28 superagonista mostrado previamente para apoyar la proliferación de linfocitos T (Waibler Z, Sender LY, *et al.* PLoS One 3:e1708 (2008)). Estos anticuerpos biespecíficos monovalentes se incubaron con PBMC humanos *in vitro* y la estimulación de linfocitos T se midió mediante secreción de interferón-γ e IL-2. Aunque ambas orientaciones eran activas, se observó liberación óptima de estas citocinas con CD3 en la posición proximal y CD28 en la posición distal (**figura 24B**). A continuación, se seleccionó este brazo doble para emparejarse con un anticuerpo anti-CD38 en el formato de Ab triespecífico (Xu L, Pegu A, *et al.* Science 358:85-90 (2017)).

La **figura 25** muestra que la regulación por aumento del miembro Bcl-xL de la familia Bcl-2 en linfocitos T primarios inducida por CD38^{VH1}/CD28^{sup}×CD3^{mid} es dependiente de CD28. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la supervivencia de los linfocitos T.

La **figura 26** muestra que anti-CD28 en el Ab triespecífico proporcionaba señalización secundaria esencial para apoyar la proliferación primaria de linfocitos T *in vitro*. Estos datos ilustran la contribución de CD28 a la proliferación de los linfocitos T.

Tomados en conjunto, estos datos muestran que anti-CD28^{sup} en el anticuerpo triespecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}×CD3^{mid} proporciona funcionalidades significativas en la activación, supervivencia y proliferación de linfocitos T *in vitro*.

La **figura 27** muestra la configuración del anticuerpo triespecífico, codificado por anticuerpo precursor. También se muestra un modelo de estructura del Ab triespecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}×CD3^{mid} obtenido basado en estructuras cristalinas de Fab VH1 anti-CD38 y Fab CD28^{sup}/CD3^{mid} (derecha).

Las **figuras 28A** y **28B** muestran que células de mieloma múltiple (MM) con alta (RPMI-8226; **figura 28A**) y baja (KMS-11; **figura 28B**) expresión en la superficie de CD38 se lisaron de manera eficaz por PBMC humanos (E:T = 10:1) incubados con diversas concentraciones del Ab triespecífico. La contribución a la actividad de destrucción por cada sitio de unión se demostró mediante mutaciones KO del sitio de unión. Estos datos demuestran que el anticuerpo triespecífico contra CD38 lisó células de MM humanas mediante el reconocimiento tanto de CD38 como de CD28.

CD28 expresado en células de mieloma múltiples proporcionó una diana secundaria por el anticuerpo trispecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}xCD3^{mid}_FALA, potenciando significativamente su actividad destructora.

Las **figuras 29A-29C** muestran que el mutante KO anti-CD28^{sup} del Ab trispecífico presentó una actividad antitumoral notablemente reducida contra células MM CD38^{high}, CD38^{mid} y CD38^{low} *in vitro*. Se muestran ensayos que usan células RPMI-8226 (**figura 29A**), U266 (**figura 29B**) o KMS-11 (**figura 29C**). La expresión de CD28 en células de MM aumentó su susceptibilidad a la citólisis mediada por el anticuerpo trispecífico contra CD38.

La **figura 30** muestra los resultados de un estudio de eficacia *in vivo* en un modelo de línea celular de mieloma múltiple humano diseminado usando un ratón NSG reconstituido con linfocitos T primarios humanos amplificados *in vitro*. La reducción de la carga tumoral en los grupos de tratamiento con anticuerpo trispecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}xCD3^{mid}_FALA fue dependiente de la dosis y estadísticamente diferente. Por tanto, el anticuerpo trispecífico contra CD38 confirió protección contra el crecimiento tumoral *in vivo* de células de MM humano diseminadas.

Un estudio microscópico demostró además la destrucción de células cancerosas por linfocitos T humanos primarios mediada por el anticuerpo trispecífico *in vitro*. Las **figuras 31A y 31B** muestran imágenes de microscopio que demuestran RPMI-8226 (células de MM humano, marcadas con tinte CellTracker Deep Red) lisadas por PBMC humanas mediado por anticuerpo trispecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}xCD3^{mid}_FALA. La **figura 31A** muestra el control, mientras que la **figura 31B** muestra la lisis mediada por anticuerpo trispecífico CD38^{VH1}/CD28^{sup}xCD3^{mid}_FALA. Se usó una relación de E:T de 10:1 con incubación de 24 h. La exposición al Ab de control mutante anulador triple indujo cambios mínimos en la viabilidad de las células tumorales durante 24 horas (**figura 31A**). Por el contrario, la incubación con el Ab trispecífico contra CD38 activo indujo una agrupación sustancial de linfocitos T alrededor de las células tumorales, lo que da lugar a su lisis casi completa (**figura 31B**). Estos datos demuestran que el anticuerpo trispecífico CD38/CD3xCD28 medió la citólisis de las células de mieloma por los linfocitos T.

Ejemplo 10: La modificación de los sitios de unión al receptor de Fc en la región Fc de IgG4 de proteínas de unión trispecíficas anti-CD38 reduce la inflamación no específica

La región Fc de los anticuerpos se une a receptores celulares en monocitos y linfocitos NK que inducen inflamación no específica, lo que podría predisponer a los sujetos de tratamiento al síndrome de liberación de citocinas. La función de los receptores de Fc en la estimulación de la liberación de citocinas se examinó ensayando mutantes que eliminaron la unión a FcγI, FcγIIa,b y FcγIII. Para este propósito, se usó un isotipo IgG4 que no fija el complemento.

Se usó la unión en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ) para medir la afinidad de las variantes de Fc de IgG4 especificadas por los receptores de Fc humanos indicados inmovilizados en el chip. Se usaron variantes de Fc de IgG4 a 150 nM. La unión a FcRn humano se realizó usando ELISA recubriendo el antígeno FcRn humano en la placa.

Una mutación ("FALA") en la región Fc que se ha descrito previamente (Alegre ML, Peterson LJ, *et al.* Transplantation 57:1537-43(1994); véanse también los ejemplos 7-9) eliminó la unión a todos los receptores de Fc (**figuras 32 y 33**). Cuando se ensayó la liberación de citocinas no específicas, se anuló la liberación de IFN-γ en PBMC no estimulados, al tiempo que se permitía la máxima estimulación en presencia de dianas tumorales que expresaban CD38 (**FIG. 34**, izquierda frente a derecha, FALA). Este mutante de Fc retuvo su actividad citolítica en dianas tumorales de mieloma comparables al control natural de Fc en células que expresan diferentes niveles de CD38 (**figura 35**). Asimismo, otra región Fc de IgG4 mutada ("PVA", véase la **figura 32**) que eliminaba la unión a receptores de Fc (**figura 33**) también anuló la liberación de IFN-γ en PBMC no estimulados, al tiempo que permitía la máxima estimulación en presencia de dianas tumorales que expresaban CD38 (**figura 34**, izquierda frente a derecha, PVA) y conservaba su actividad citolítica en dianas tumorales de mieloma comparable al control natural de Fc en células que expresan diferentes niveles de CD38 (**figura 35**).

Ejemplo 11: Contribución de anti-CD38 y anti-CD28 a la actividad citolítica de proteínas de unión trispecíficas

Se generaron mutantes de Ab trispecíficos para cada sitio de unión o combinación de sitios de unión y se ensayaron para determinar su actividad citolítica contra líneas celulares de mieloma múltiple con expresión en superficie alta (RPMI-8226) o baja (KMS-11) de CD38 y CD28.

Como se muestra anteriormente en las **figuras 28A y 28B**, la mutación de la unión específica a CD3 anuló la citólisis, mientras que las mutaciones anuladoras anti-CD38 y CD28 mostraron una destrucción notablemente reducida, pero se mantuvo algo de función residual, lo que indica que tanto anti-CD38 como CD28 contribuían a la destrucción de las células tumorales.

En comparación con daratumumab (el anticuerpo monoclonal contra α-CD38 aprobado para el tratamiento de mieloma múltiple; véase McKeage K. Drugs. 76:275-81(2016)), el Ab trispecífico mostró una notable potencia de destrucción 3-4 log más alta *in vitro* contra diferentes líneas celulares que expresan CD38, que incluyen células de mieloma múltiple tanto CD38^{high} como CD38^{low} (**figura 36**).

Ejemplo 12: El Ab CD38/CD3xCD28 estimula Th1 de memoria central CD4 y CD8 y respuestas específicas de antígeno

- 5 Para determinar si el Ab trispecífico CD38/CD3xCD28 podía potenciar la función inmunitaria celular, se evaluó el fenotipo de linfocitos T expandidos *in vitro*.

Materiales y métodos

- 10 Se aislaron leucocitos monomorfonucleares de la sangre periférica de sangre de donadores humanos sanos recogida por Research Blood Components, LLC (Boston, MA). Los PBMC se añadieron a placas recubiertas de anticuerpo (350 ng/pocillo) (5×10^5 células/ml), como se describe anteriormente, y se incubaron a 37 °C durante 3 y 7 días. Las células se recogieron en puntos temporales específicos y se analizaron por citometría de flujo para subconjuntos de linfocitos T: vírgenes (CCR7+ CD45RO-), Tcm (CCR7+ CD45RO+), Tern (CCR7- CD45RO+), Treg (CD4+ Foxp3+ CD25hi). Las
- 15 células también se trataron con monensina (GolgiStop) (BD Biosciences, CA) durante al menos 6 horas antes de la tinción de flujo para determinar la expresión de citocinas intracelulares: Th1 (CD4+ IFN- γ +), Th2 (CD4+ IL-4+) y Th17 (CD4+ IL-17+). Se detectaron linfocitos T CD8+ específicos de pp65 de CMV usando pentámero conjugado fluorescente restringido al HLA de los donadores de PBMC (A*02:01/NLVPMVATV) (ProImmune, Oxford, Reino Unido). Los PBMC se obtuvieron de HemaCare (Van Nuys, CA) de donadores con poblaciones positivas a CMV y tipos de
- 20 HLA conocidos. Se usaron PMBC de donadores negativos para el tipo de HLA restrictivo como control negativo. La tinción se hizo según el protocolo del fabricante.

Resultados

- 25 Los PBMC humanos se incubaron durante 7 días con el Ab trispecífico o un control negativo mutante triple en ausencia de citocinas. El análisis de los subconjuntos CD4 reveló la mayor proliferación en la combinación de memoria central, con un aumento más pequeño en las células de memoria efectoras (**figura 37A**). El análisis del subconjunto CD4 también reveló la mayor proliferación de linfocitos Th1 (>6 veces) en comparación con linfocitos Th2 o Th17 (**figura 37B**). En el subconjunto CD8, hubo un aumento >150 veces en el subconjunto CD8 de memoria central en el
- 30 día 7, con un aumento menor en las células de memoria efectoras (**figura 37C**). Es importante destacar que las respuestas CD8 específicas de antígeno preexistentes al CMV, dirigidas al epítipo pp65 en donadores HLA-A2 seropositivos usando tinción de tetrámero (Gratama JW, van Esser JW, *et al.* Blood 98:1358-1364 (2001)), aumentó >44 veces en presencia del trispecífico de CD38 en comparación con el control negativo (**figura 37D**).
- 35 Tomados en conjunto, estos datos indican que el Ab trispecífico de CD38 estimula la función **Th1** y las respuestas protectoras de linfocitos T de memoria CD8 que probablemente potencian la inmunidad antitumoral *in vivo*.

Ejemplo 13: CD28 en células de mieloma múltiple aumenta el reconocimiento de linfocitos T y la citólisis**Materiales y métodos**

- 40 **Citometría de flujo**
- Los niveles de CD28 y CD38 en las líneas celulares tumorales indicadas se determinaron mediante citometría de flujo usando el kit QIFI (Dako, Dinamarca, cat. n.º K007811) como se describe (S4). En resumen, se usaron anticuerpo de
- 45 ratón anti-CD38 humano (clon AT13/5, IgG1 de ratón, Santa Cruz Biotech, cat. n.º 59028) y anti-CD28 humano (clon CD28.2, IgG1 de ratón, k, BioLegend, cat. n.º 3029123) como anticuerpos primarios (a 10 μ g/ml) para detectar CD38 y CD28 de superficie en las líneas celulares usando el protocolo del fabricante. Las densidades superficiales se calcularon usando patrones de calibración del kit QIFI y la formulación proporcionada por el kit.
- 50 **Generación de líneas celulares de mieloma múltiple humano CD28 KO usando inactivación mediada por CRISPR**

- Para la línea celular KMS-11, la inactivación de CD28 se realizó usando el kit de inactivación de CD28 humano por CRISPR (Origene). El kit contiene un vector donador con un casete funcional de GFP-puromicina y dos vectores de
- 55 Cas-9 distintos cada uno con un ARN guía prediseñado diferente (ARNg1: TACCTGTTACTTGAATTGAA (SEQ ID NO: 117) y ARNg 2: ATTTTGTGAGGTCTTCCAAT (SEQ ID NO: 118) dirigidos al exón 1 y al intrón 1 de CD28, respectivamente). Las células se sembraron en una placa de 6 pocillos a una densidad de 3.10^5 células/pocillo en medio RPMI 1640 GlutaMAX complementado con FBS al 10 % y se cotransfectaron después de 24 horas con los tres
- 60 vectores usando reactivo de transfección Lipofectamine™ 3000 (ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió puromicina 48 horas después de la transfección a una concentración final de 0,5 μ g/ml. La eficacia de transfección fue de un 30 % cuando se usaron 6,25 μ l/pocillo de Lipofectamine™ 3000, 1,25 μ g de cada vector de Cas-9/ARNg y 2,5 μ g del vector donador de GFP-puromicina. La inactivación de CD28 en la
- 65 línea celular RPMI 8226 se realizó usando el conjunto de lentivirus todo en uno de CRISPR con ARNgp de CD28 (Applied Biological Materials Inc.). Consiste en un conjunto de 3 vectores lentivíricos todo en uno que expresan el gen Cas9, un gen de resistencia a puromicina y un ARNgp diferente (ARNgp 1: ATTGTCGTACGCTACAAGCA (SEQ ID NO: 119) dirigido al exón 2 de CD28 y ARNgp 2: CAAAAGGGCTTAGAAGGTCC (SEQ ID NO: 120) y ARNgp 3:

CTATAGCTTGCTAGTAACAG (SEQ ID NO:121) dirigido al exón 3 de CD28). Las células se infectaron usando un protocolo de espinoculación con $2 \cdot 10^5$ células mezcladas con partículas lentivíricas (10 UI/célula), 8 µg/ml de polibreno y potenciador de la transducción ViralPlus 1:100 (Applied Biological Materials Inc.). La mezcla se preincubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó durante 30 minutos a 32 °C y 800 ×g y se sembró en una placa de 12 pocillos. Se añadió puromicina 48 horas después de la infección a una concentración final de 0,25 µg/ml. Ambas líneas celulares se pasaron al menos 5 veces (o hasta que la viabilidad celular quedó estable) antes de confirmar la inactivación de CD28 a nivel de proteína por citometría de flujo (anticuerpo CD28 PE clon 28.2 - BioLegend). Las células CD28 negativas se clasificaron entonces en un clasificador celular Sony SH800S y se cultivaron en medio complementado con 0,25 µg/ml o 0,5 µg/ml de puromicina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (ThermoFisher Scientific). A continuación, las células se clonaron por dilución limitante y la inactivación de CD28 se validó por citometría de flujo y por PCR y secuenciación de Sanger usando los cebadores directos e inversos enumerados a continuación.

Tabla R. Lista de cebadores directos e inversos.

Línea celular	Amplicón	Cebadores	Tamaño del amplicón	Comentarios
KMS-	CD28_GFP_left	F: CACAACTGTGCCCCATCCTATGAA (SEQ ID NO:122) R: AAGCTGCCATCCAGATCGTTATCG (SEQ ID NO:123)	1475 pb	Valida la inserción del casete de GFP-puromicina (lado izquierdo)
	CD28_PURO_right	F: CCAAATTAAGGGCCAGCTCATTC (SEQ ID NO:124)	1233 pb	Valida la inserción del casete de GFP-puromicina (lado derecho)
RPMI 8226	CD28_Exon_1	R: ACCTGTACATCCTTGGGCAAATCC (SEQ ID NO:125)		Región que rodea la unión del exón 1-intrón 1 de CD28 correspondiente al sitio de inserción del casete de GFP-puromicina y/o indels después de CRISPR
		F: GTCAGGATGCCTTGTGGTTGAGT (SEQ ID NO:126) R: CAGAGCTTCCAGAGCCAATCTAC (SEQ ID NO:127)	Variable; WT = 720	
	Exon_2	F: CCATGTACTGCCTTCTGGGTGAAA (SEQ ID NO:128)	Variable; WT = 682 pb	Región de escisión que rodea el exón 2 de CD28 correspondiente a los sitios de escisión de CRISPR
		R: CCACTGACCACAACCCAGTTTT (SEQ ID NO: 129)		
	Exon_3	F: AGGCCATTGGAAGTCACCGTTT (SEQ ID NO: 130)		

Línea celular	Amplicón	Cebadores	Tamaño del amplicón	Comentarios
		R: GCCAACATTGTCCATTGGCTTCAG (SEQ ID NO:131)	Variable; WT = 816 pb	Región que rodea el exón 3 de CD28 correspondiente a los sitios de escisión de CRISPR

Resultados

5 CD28 se incorporó en el Ab triespecífico para mejorar la proliferación y supervivencia de linfocitos T; sin embargo, cuando se evaluaron marcadores de superficie celular en células de mieloma múltiple, se encontró que la mayoría de las líneas celulares (>95 %) expresaba la glucoproteína CD28 (tabla S).

Tabla S. Expresión en la superficie celular de CD28 y CD38 en líneas celulares de mieloma múltiple humano.

Línea 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	981,310
RPMI 8226-CD38++	86,320	1,419,120

10 Se ha informado de que la expresión de CD28, aunque está ausente en células plasmáticas normales (Almeida J, *et al.* British J. of Haematol. 107:121-131(1999)), puede detectarse en células plasmáticas de mieloma primario en aproximadamente un tercio de los pacientes recién diagnosticados (Mateo G, *et al.* Clin. Cancer Res. 11:3661-3667 (2005)). Además, aumenta en frecuencia durante la progresión del mieloma y se correlaciona con un mal pronóstico y rasgos característicos agresivos del mieloma (Robillard N, Jegou G, *et al.* Clin Cancer Res. 4:1521-6 (1998); Nair JR, Carlson LM, *et al.* J Immunol. 187:1243-53 (2011)).

15 Para determinar si la expresión de CD28 en células diana podría mejorar el reconocimiento y la lisis por linfocitos T, se comparó la actividad de Ab natural frente a triespecífico nulo contra CD28 en tres líneas de mieloma independientes con grados variables de expresión de CD38 y CD28. Como se indica anteriormente en el ejemplo 9 y se muestra en las **figuras 29A-29C**, se observó citólisis en las tres líneas, independientemente del nivel de expresión de CD28 por el Ab triespecífico de CD38; sin embargo, contra todas las líneas celulares, la actividad citolítica del Ab triespecífico nulo contra CD28 se redujo 30-100 veces, con la disminución más sustancial en la línea celular KMS-11, que mostró la expresión más baja de CD38 (véase WT frente a Δ CD28, **figura 29C** frente a **figura 29A** o **figura 29B**).

20 La contribución de CD28 al reconocimiento de células tumorales y a la lisis se confirmó adicionalmente usando inactivación CD28 mediada por CRISPR en la célula diana de mieloma. La expresión de CD28 fue indetectable en células CD28KO KMS-11 en comparación con la línea precursora (**figura 38**, panel superior, derecha frente a izquierda). La sensibilidad de las células CD28KO KMS-11 a la citólisis por linfocitos T se redujo simultáneamente 10-100 veces (**figura 38**, panel inferior, izquierda). Coherente con este efecto, no se observó diferencia en la citólisis con

el triespecífico de CD38 en comparación con el triespecífico mutante nulo contra CD28 en las células diana CD38 KO (**figura 38**, panel inferior, derecha).

Ejemplo 14: Citólisis del Ab triespecífico de CD38 contra líneas celulares de cáncer hemático CD38⁺ (no forma parte de la presente invención)

Los ejemplos previos muestran anticuerpos anti-CD38/CD3/CD28 triespecíficos que promueven la citólisis de células de mieloma múltiple. Se ensayó la capacidad de estos anticuerpos de promover la citólisis de otras líneas celulares cancerosas.

Como se muestra en la **figura 39**, el Ab mutante FALA triespecífico CD38/CD28xCD3 tenía actividad citolítica dirigida a líneas CD38⁺CD28⁻, incluyendo leucemia mielocítica aguda (AML (KG-1)), un linfoma de linfocitos B (OCI-Ly19), leucemia linfocítica T aguda (ALL (KOPN8)) y linfoma linfocítico crónico (CLL(Z-138)). Esto demuestra que los anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD3/CD28 tienen actividad contra otras líneas celulares de cáncer hemático CD38⁺, incluyendo las que son CD28⁻.

Ejemplo 15: La activación *in vitro* de PBMC humanos por superagonista de α -CD28 requiere bivalencia del anticuerpo

La activación *in vitro* de PBMC humanos por TGN1412 (TGN), el brazo de unión individual TGN1412 (TGNslg) y el brazo de unión individual anti-CD28_{sup} (CD28_{sup}slg) se realizó como se describe (Findlay L, Eastwood D, *et al.* J Immunol Methods 352:1-12 (2010)). Se sembraron 10⁵ PBMC humanos en placas de polipropileno de 96 pocillos recubiertas en seco con los anticuerpos indicados (1 ug/pocillo) durante 24 horas como se describe previamente. Se midieron citocinas tales como IFN- γ , TNF- α e IL2 en el sobrenadante por Luminex como se describe en el ejemplo 8.

La inclusión de una sola especificidad del superagonista de CD28 también redujo la liberación de citocinas no específicas observada con el mAb superagonista de CD28 (**figura 40**) asociada previamente con sus efectos adversos como IgG natural en seres humanos (Suntharalingam G, Perry MR, *et al.* N Engl J Med 355:1018-1028 (2006)). En cambio, la coestimulación por el Ab triespecífico aumentó la potencia y supervivencia de linfocitos T que lisan y protegen contra los tumores. De forma más interesante, el Ab triespecífico de CD38 amplifica preferentemente poblaciones de linfocitos Th1 y Tcm *in vitro*, mostrando un rasgo característico importante que difiere del Ab monoclonal agonista de α -CD3 o superagonista de α -CD28 usado para propagar Treg para inducir tolerancia (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)).

Tomados en conjunto, los datos presentados en los ejemplos 1-15 muestran anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD3/CD28 que estimulan una potente inmunidad antitumoral mediante el acoplamiento de dos receptores de señalización de linfocitos T y la potenciación del reconocimiento de células diana. La unión a CD3 y CD28 activó la señalización del receptor de linfocitos T que reguló por aumento Bcl-xl e inhibió la apoptosis de linfocitos T, aumentando la función efectora y la supervivencia de los linfocitos T. El tercer brazo del Ab triespecífico interactuó con CD38, que se expresa altamente en células de mieloma múltiple. De forma coincidente, CD28 también se expresa en células de la mayoría de los mielomas; por lo tanto, el Ab triespecífico mejoró la dirección al mismo tiempo que potenció la activación de linfocitos T y la citólisis. El anticuerpo triespecífico optimizado lisó células de mieloma >1000 veces más eficazmente que daratumumab, un mAb anti-CD38 terapéutico, y mostró potente actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de ratón humanizado.

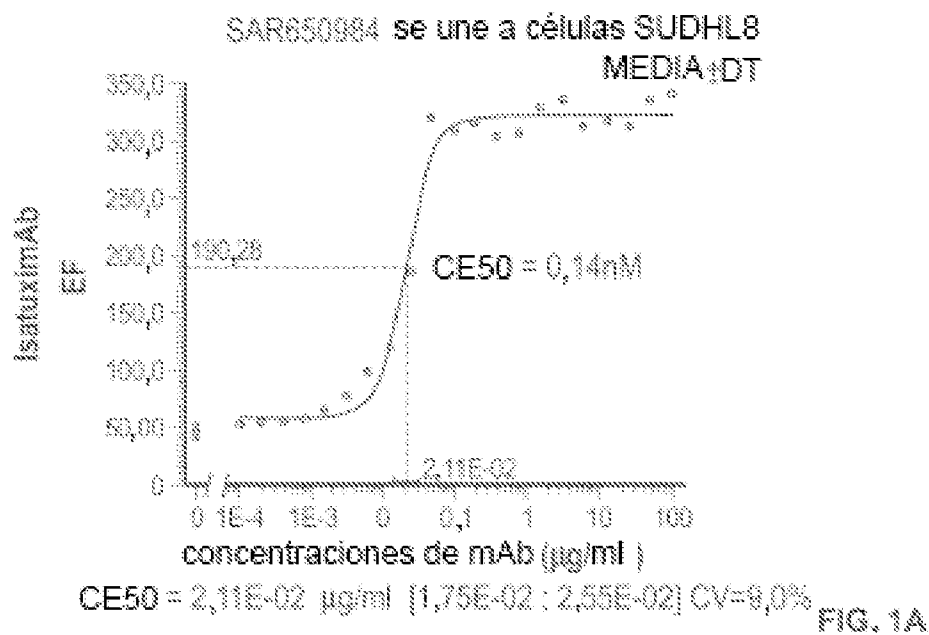
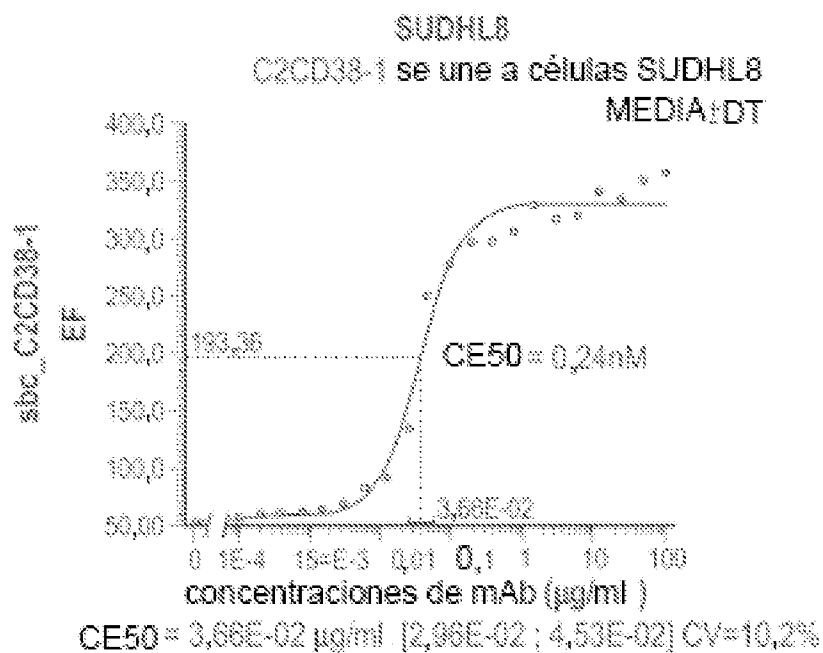
Cada realización descrita en este documento puede combinarse con cualquier otra realización o realizaciones salvo que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier rasgo característico o realización indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otro rasgo característico o rasgos característicos o realización o realizaciones indicadas como preferidas o ventajosas, salvo que se indique claramente lo contrario.

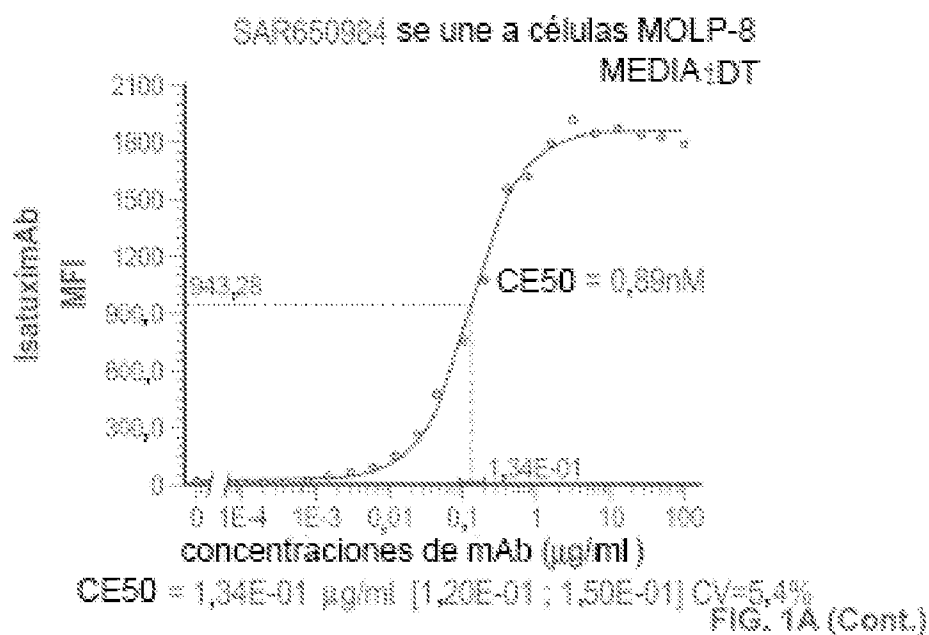
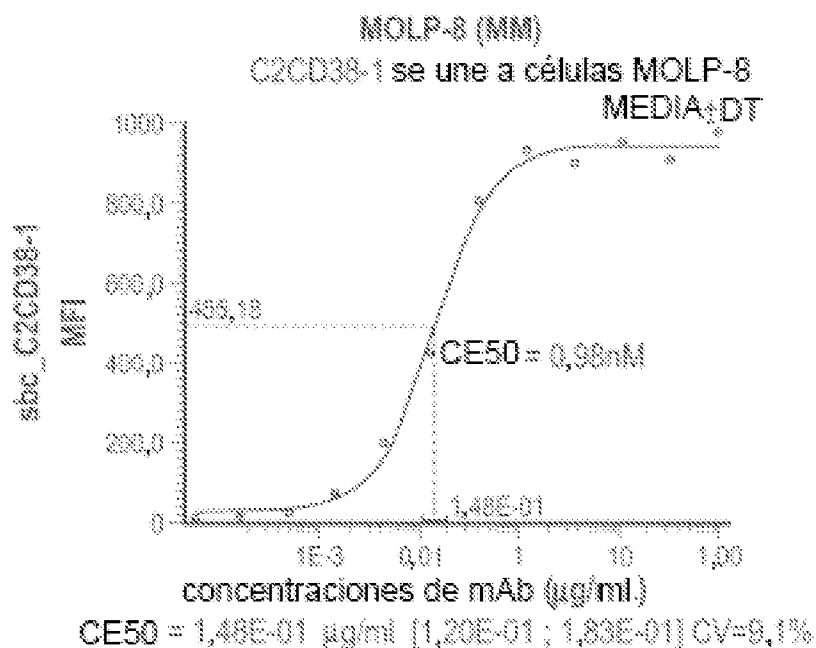
REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38, en donde el sitio de unión a antígeno comprende:
 - (a) un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (VH) que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYA (SEQ ID NO: 37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGQGGT (SEQ ID NO: 38) y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO: 33); y
 - (b) un dominio variable de la cadena ligera de anticuerpo (VL) que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSVSSYGQGF (SEQ ID NO: 39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de GAS (SEQ ID NO: 40) y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO: 36).
2. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde:
 - (a) el dominio VH comprende la secuencia, del extremo N al extremo C, FR1-CDR-H1-FR2-CDR-H2-FR3-CDR-H3-FR4; en donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVCKAS (SEQ ID NO: 87) o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO: 88); en donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO: 90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (SEQ ID NO: 91); en donde FR3 comprende la secuencia NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 93) o NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISLRSEDVAVYFC (SEQ ID NO: 94); y en donde FR4 comprende la secuencia WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 96); o
 - (b) el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, en donde opcionalmente la proteína de unión comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.
3. La proteína de unión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el sitio de unión a antígeno reacciona de forma cruzada con un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de macaco cangrejero; opcionalmente en donde el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; opcionalmente en donde el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 2,1 nM o menos; opcionalmente en donde el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 humano de isoforma E que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105; opcionalmente en donde el sitio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y opcionalmente en donde el sitio de unión a antígeno se une al polipéptido CD38 de macaco cangrejero que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 con una constante de disociación en equilibrio (K_D) de 1,3 nM o menos.
4. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de unión es un anticuerpo quimérico o humanizado; o en donde la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal.
5. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de unión comprende una o más cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa que comprenden una región Fc; en donde opcionalmente:
 - (a) la región Fc es una región Fc humana que comprende una o más mutaciones que reducen o eliminan la unión al receptor de Fc y/o la función efectora de la región Fc;
 - (b) la región Fc es una región Fc de IgG1 humana y opcionalmente:
 - (1) la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son L234A, L235A y P329A, o
 - (2) la región Fc de IgG1 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299 y 300 de IgG1 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S298N, T299A y Y300S; o
 - (c) la región Fc es una región Fc de IgG4 humana y opcionalmente:
 - (1) la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son S228P y R409K, y/o
 - (2) la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son F234A y L235A, o la región Fc de IgG4 humana comprende sustituciones aminoacídicas en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana de acuerdo con el índice EU, en donde las sustituciones aminoacídicas son E233P, F234V, L235A y una eliminación en 236.
6. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la proteína de unión comprende un fragmento de anticuerpo F(ab), F(ab')₂, Fab'-SH, Fv o scFv.
7. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde:

(a) la proteína de unión se conjuga con un agente citotóxico o marcador; o
(b) la proteína de unión es una proteína de unión biespecífica que comprende el primer sitio de unión a antígeno que se une al polipéptido CD38 y un segundo sitio de unión a antígeno.

- 5 8. Un polinucleótido que codifica la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8.
- 10 10. Una célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8 o el vector de la reivindicación 9.
11. Un método de producción de una proteína de unión, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 10 de manera que se produzca la proteína de unión, en donde el método comprende opcionalmente además recuperar la proteína de unión de la célula hospedadora.
- 15 12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en un método de prevención y/o tratamiento del cáncer en un paciente, en donde opcionalmente el paciente es un ser humano.
- 20 14. La proteína de unión o composición para el uso de la reivindicación 13, en donde el método comprende coadministrar la al menos una proteína de unión o composición con un agente quimioterápico.
- 25 15. La proteína de unión o composición para el uso de la reivindicación 13 o reivindicación 14, en donde el cáncer es mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) o un linfoma de linfocitos B.
- 30 16. La proteína de unión o composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en donde el paciente se selecciona para el tratamiento porque las células del cáncer expresan un polipéptido CD38 humano de isoforma E en su superficie celular.





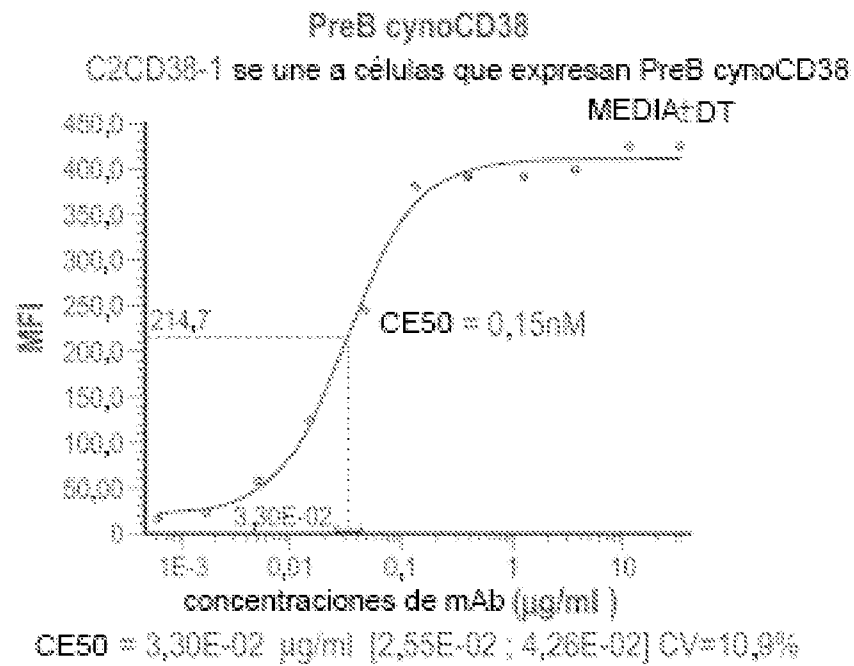


FIG. 1B

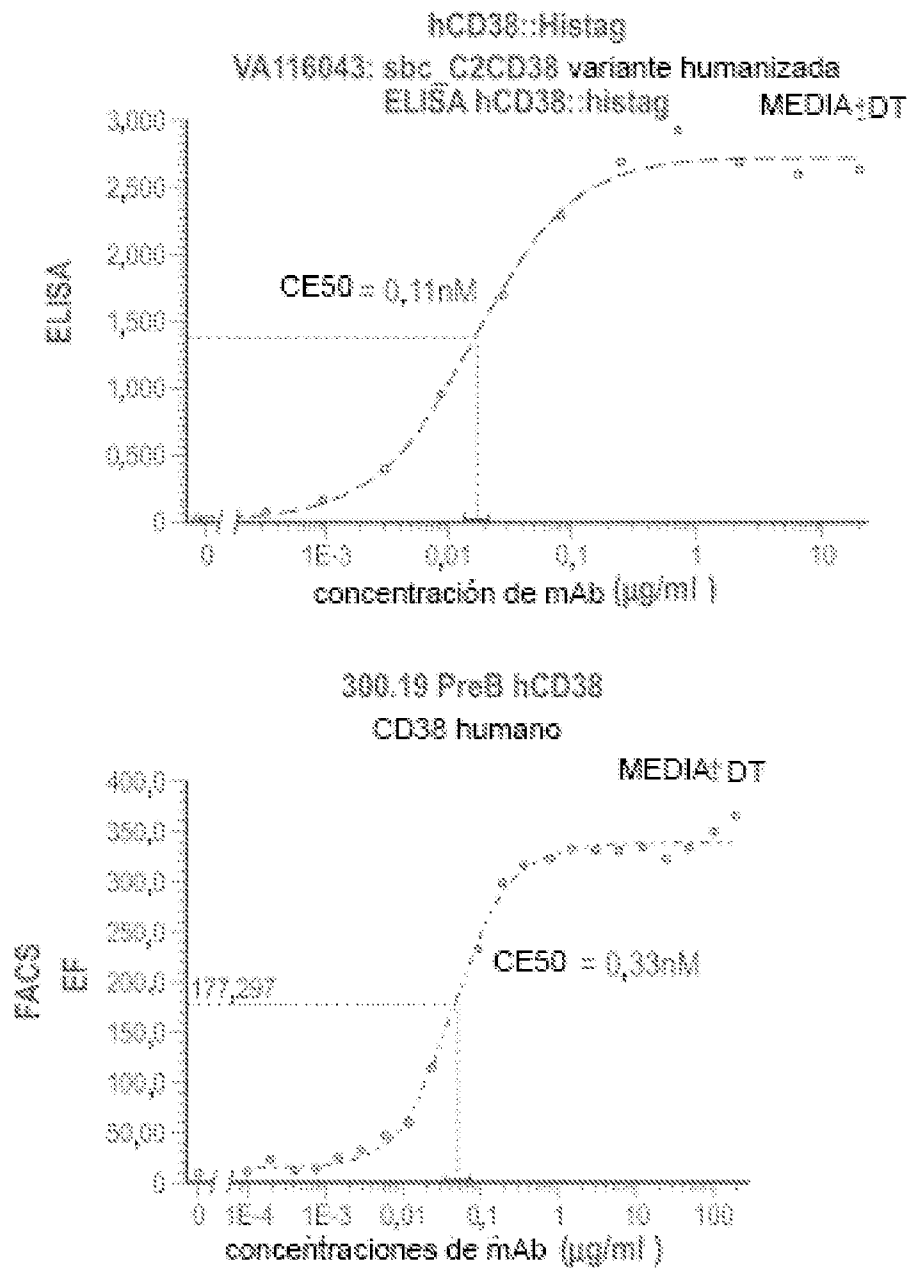


FIG. 2A

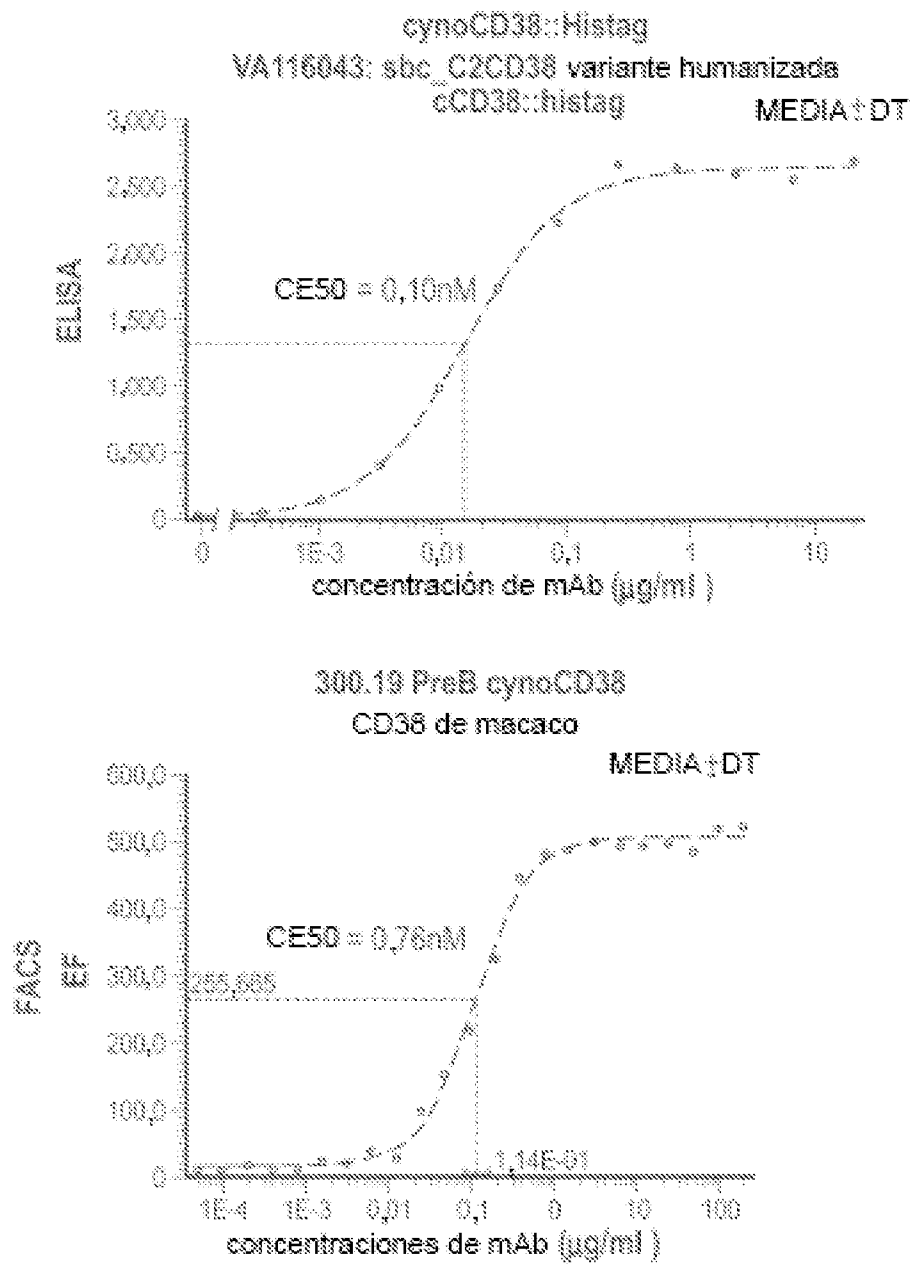


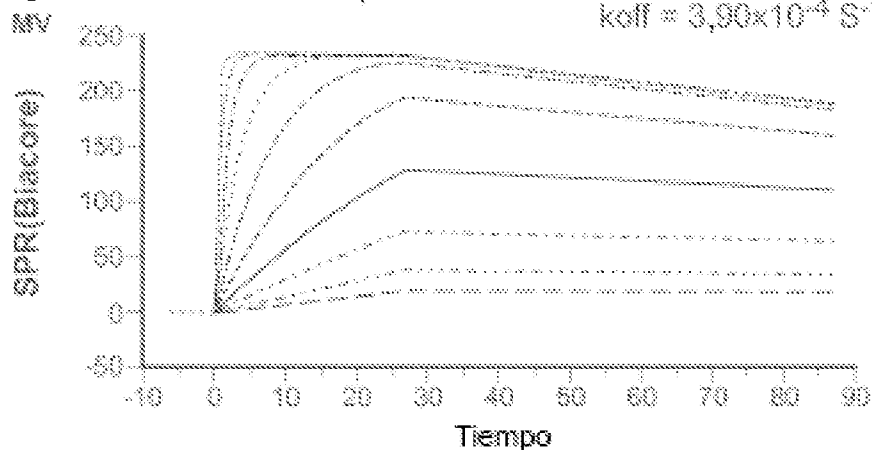
FIG. 2A (Cont.)

hCD38::Histag

Cinética: VA116048-hCD38::His
2-1 T4, fit'1. Unión 1:1

Curva: Fc*3-1 diana de ligando
4 ligando de muestra 1 Temp 25°C

$K_D = 3,32 \times 10^{-10} \text{ M}$
 $k_{off} = 3,90 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$



cynoCD38::Histag

Cinética: VA116048-cCD38::His
2-1 T4, fit'1. Unión 1:1

Curva: Fc*3-1 diana de ligando
4 ligando de muestra 1 Temp 25°C

$K_D = 3,44 \times 10^{-9} \text{ M}$
 $k_{off} = 7,84 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$

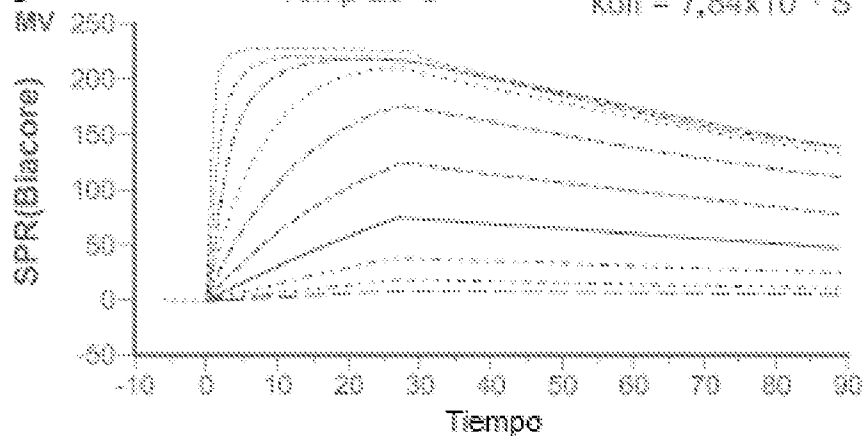


FIG. 2B

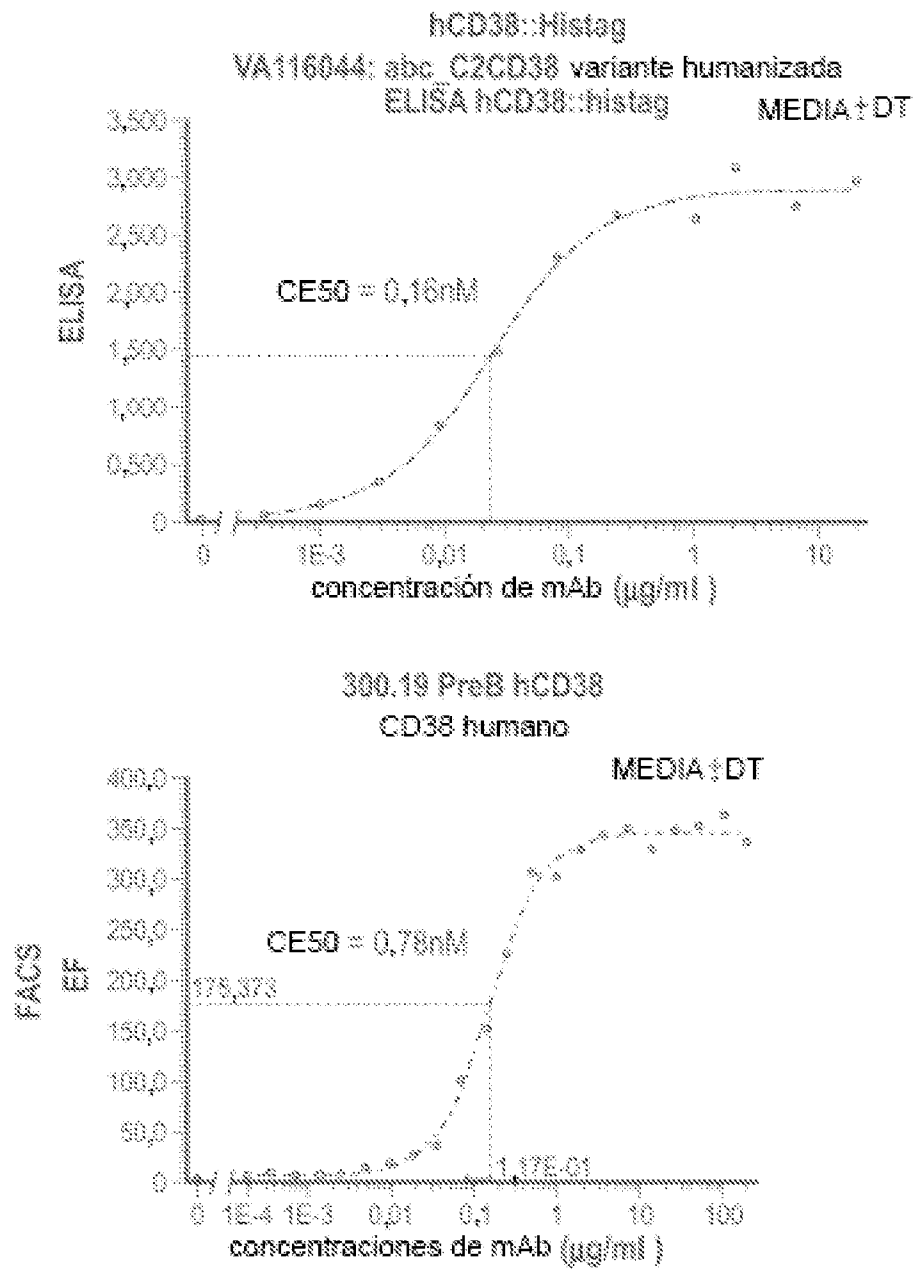


FIG. 2C

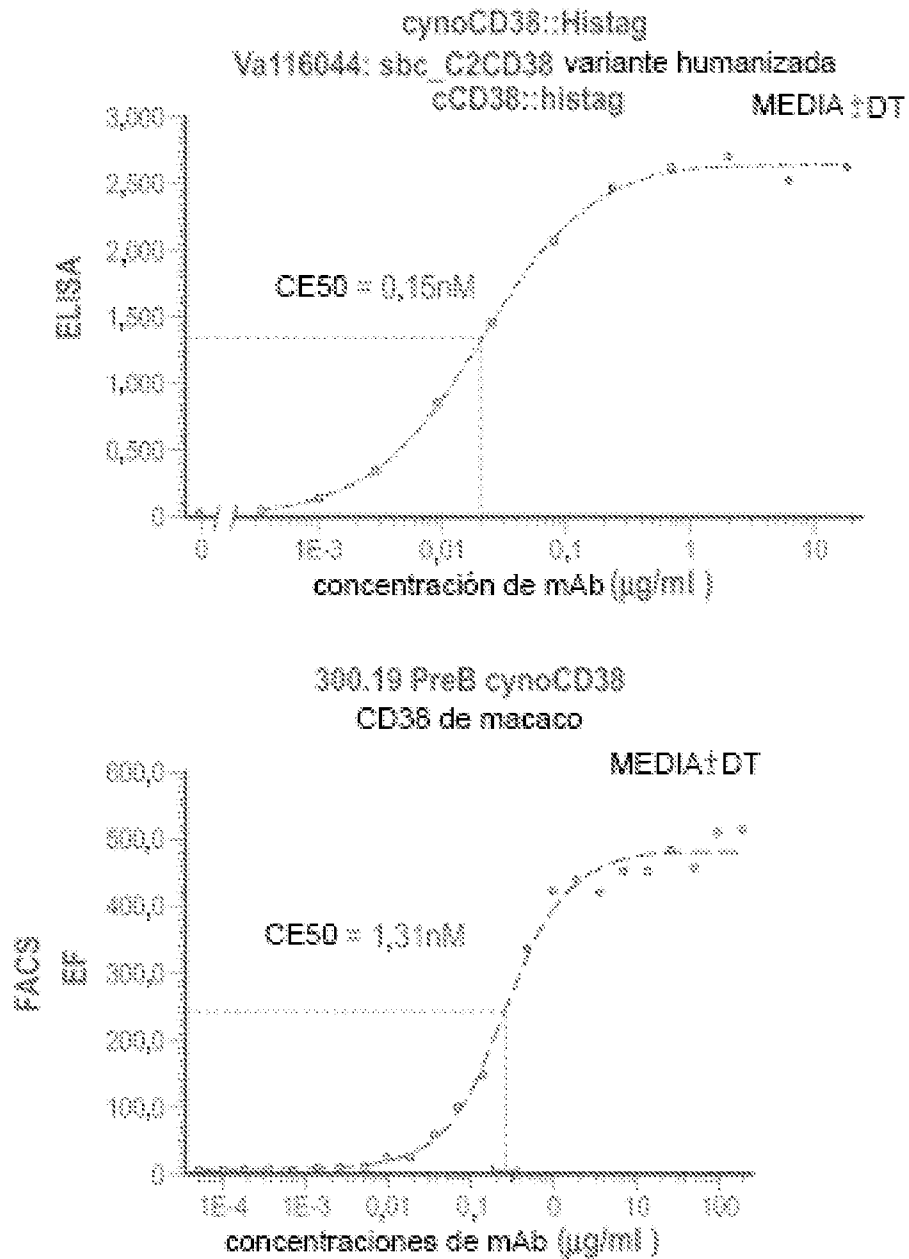
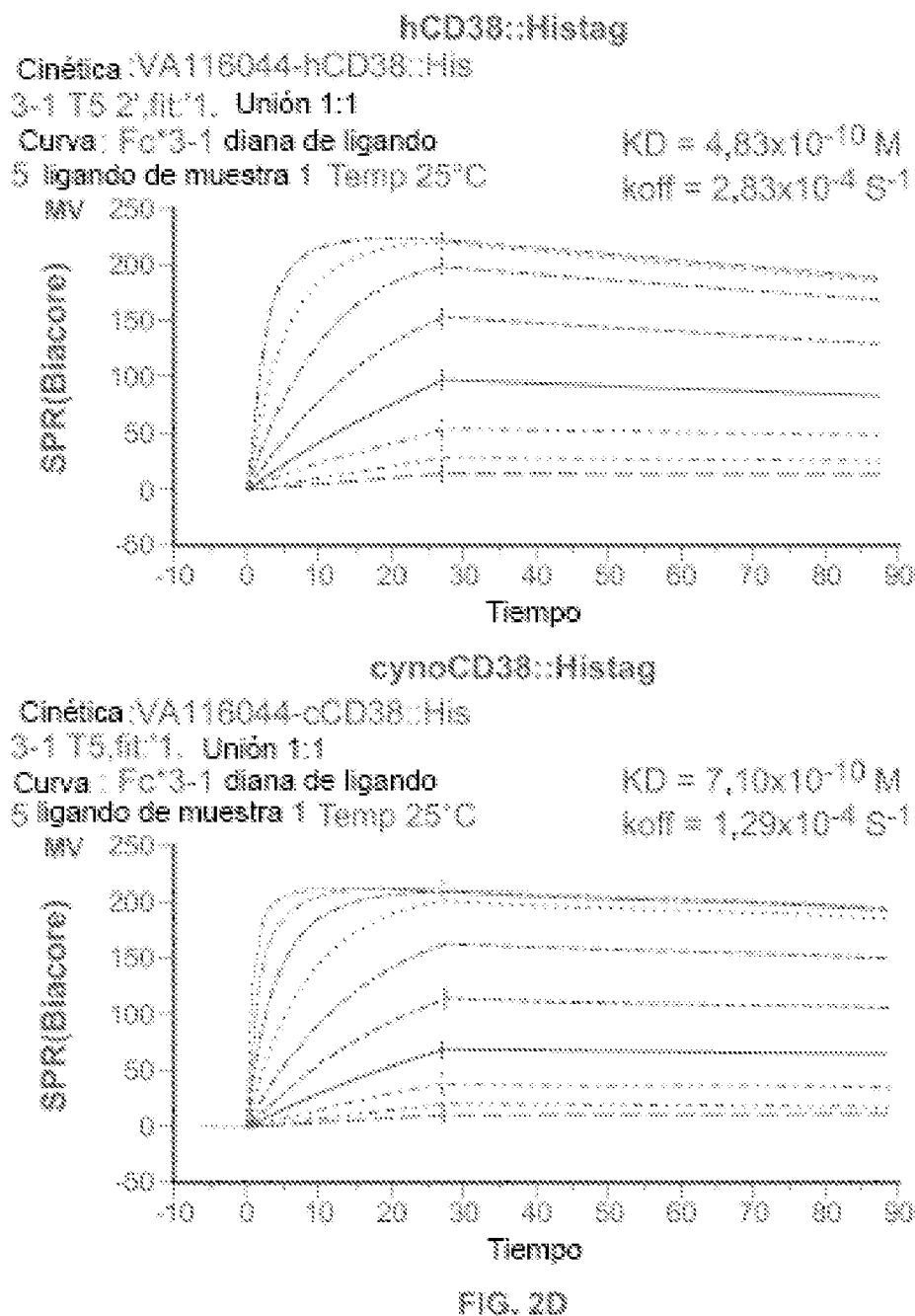


FIG. 2C (Cont.)



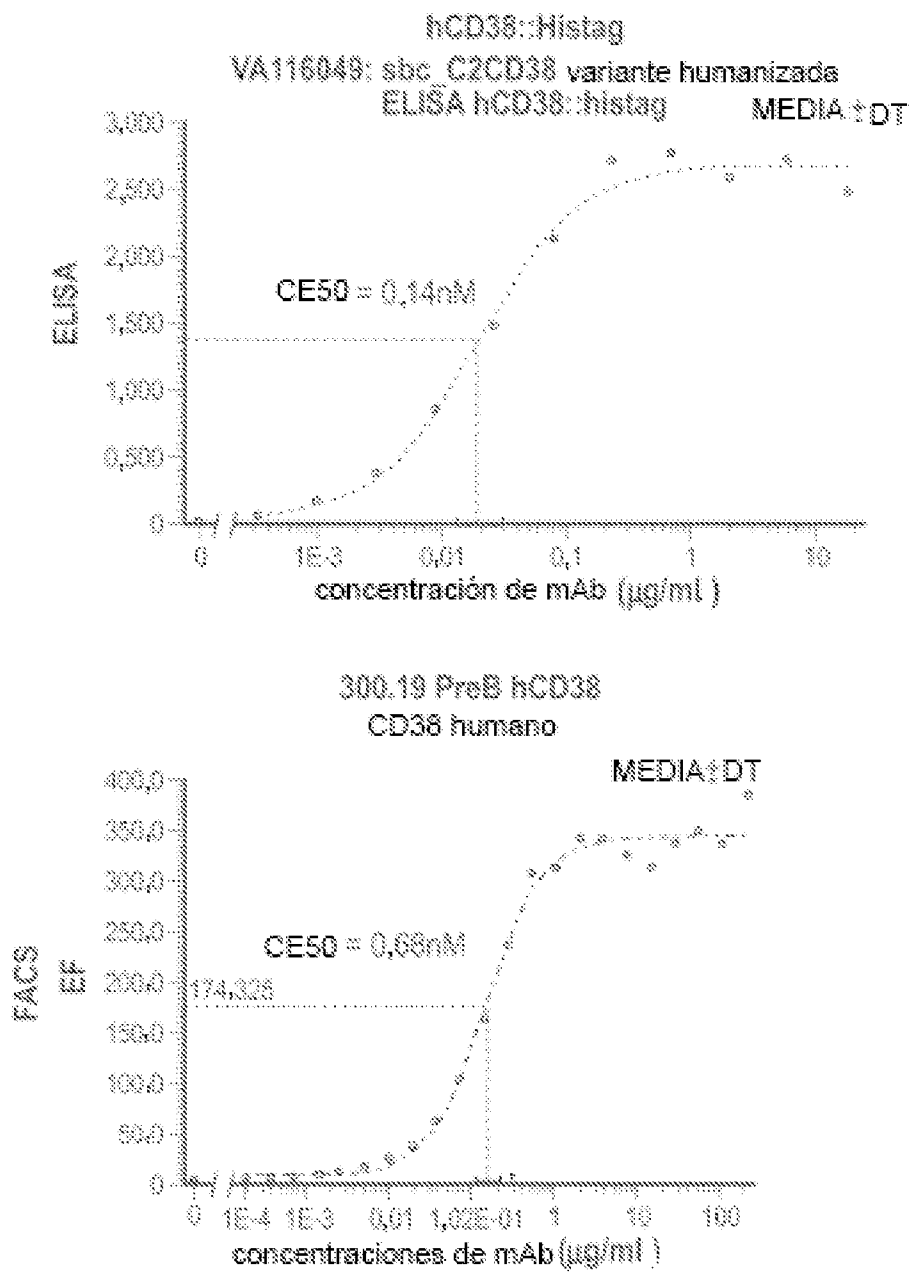


FIG. 2E

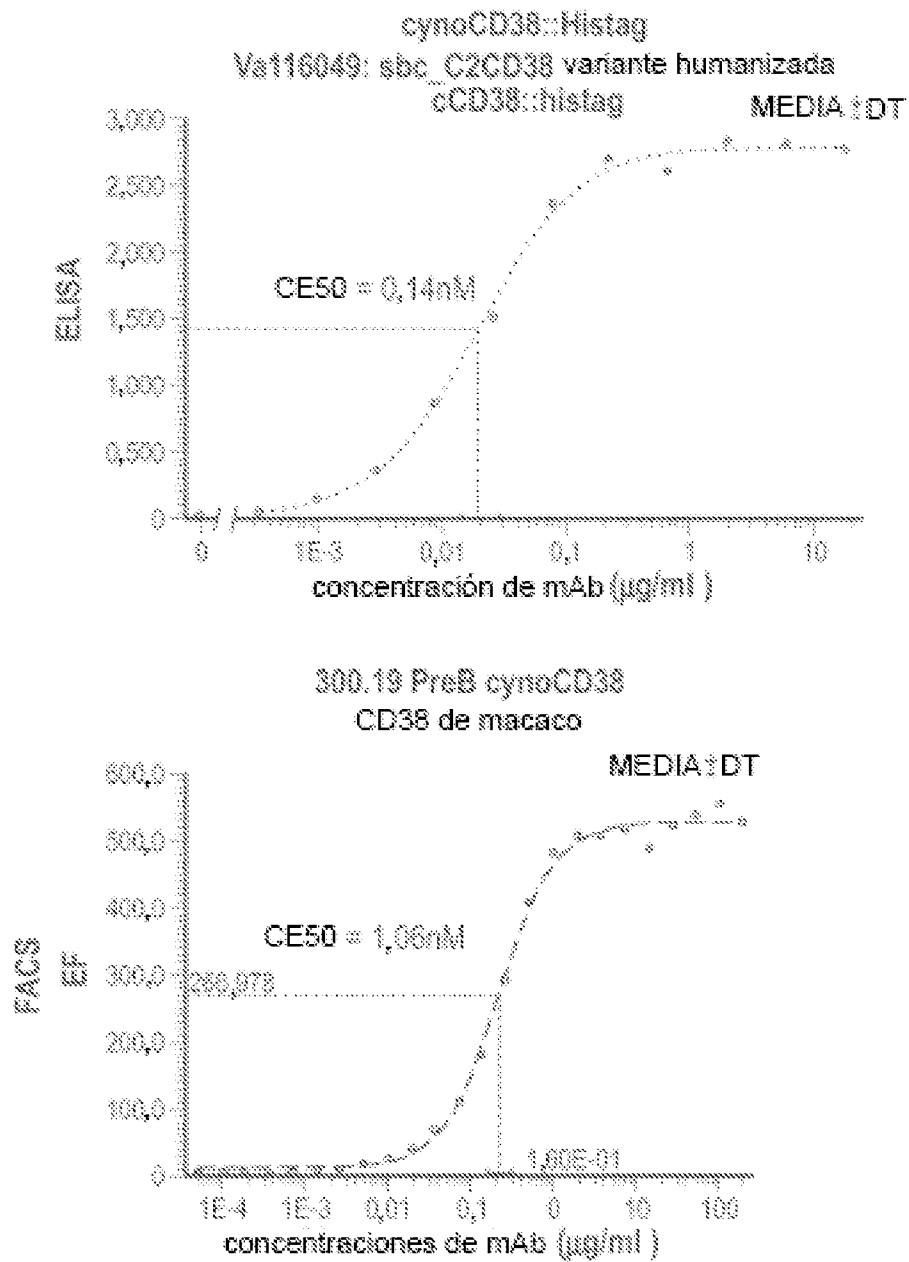
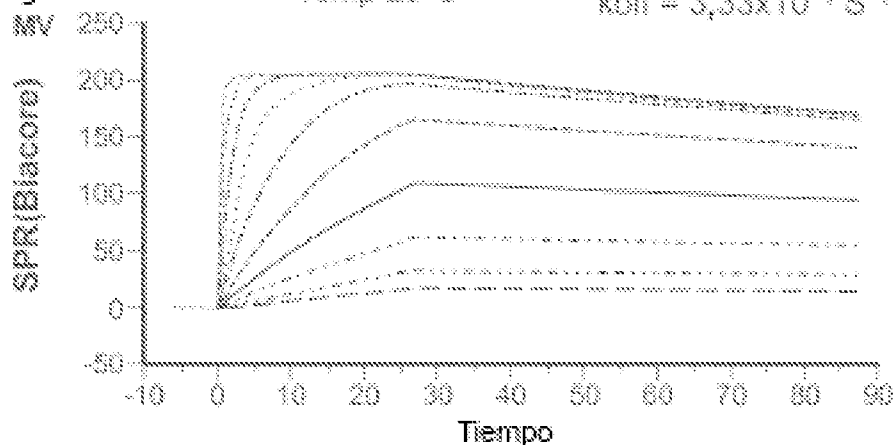


FIG. 2E (Cont.)

hCD38::Histag
 Cinética VA116049-hCD38::His
 2-1 T4, fit'1. Unión 1:1
 Curva: Fc*2-1 diana de ligando
 4 ligando de muestra 1 Temp 25°C
 $K_D = 3,12 \times 10^{-10} \text{ M}$
 $k_{off} = 3,33 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$



cynoCD38::Histag
 Cinética VA116049-cCD38::His
 2-1 T4 2', fit'1. Unión 1:1
 Curva: Fc*2-1 diana de ligando
 4 ligando de muestra 1 Temp 25°C
 $K_D = 5,63 \times 10^{-10} \text{ M}$
 $k_{off} = 1,25 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$

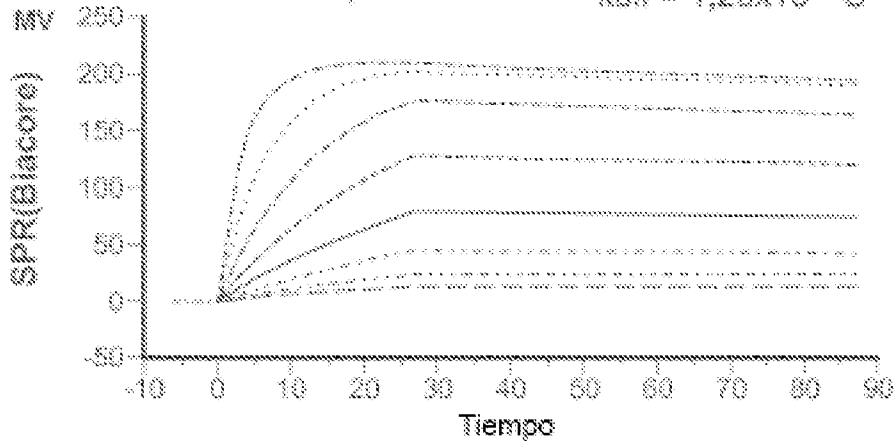


FIG. 2F

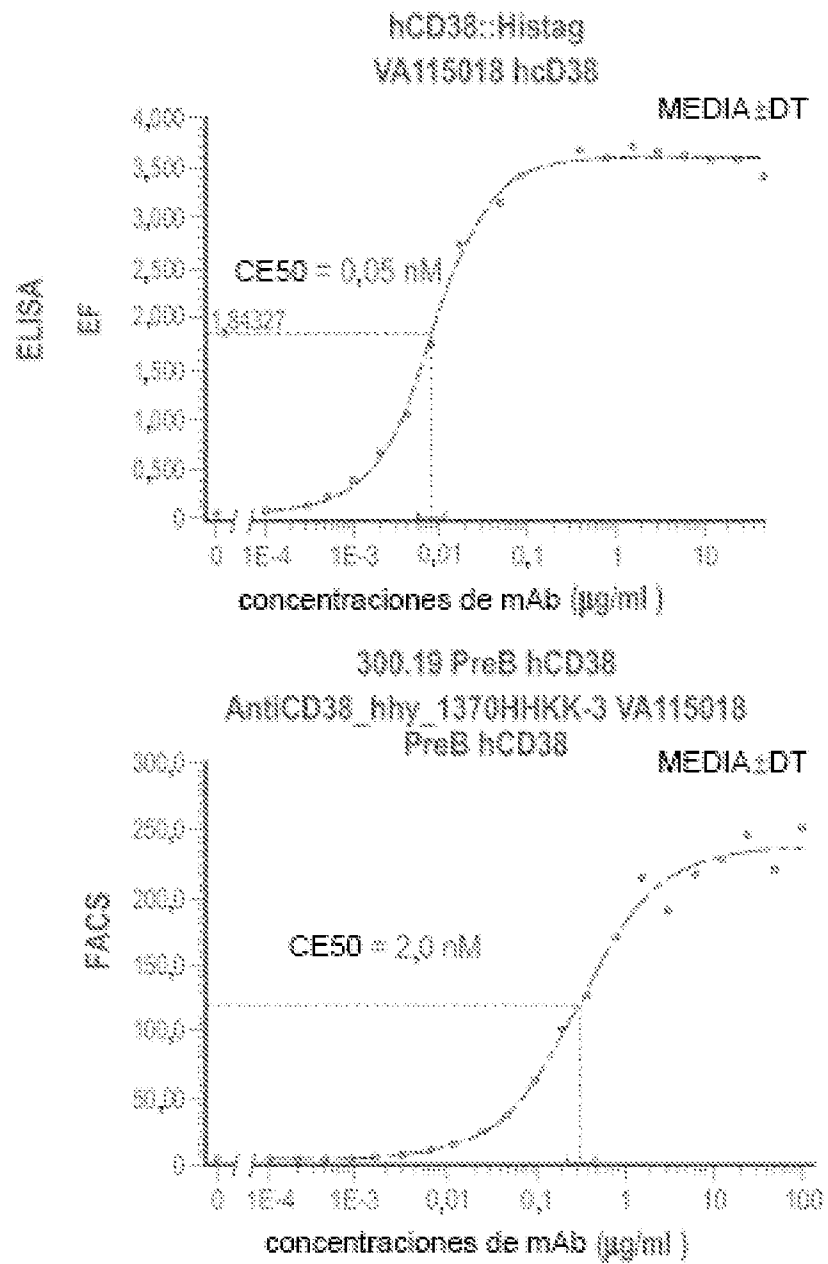


FIG. 2G

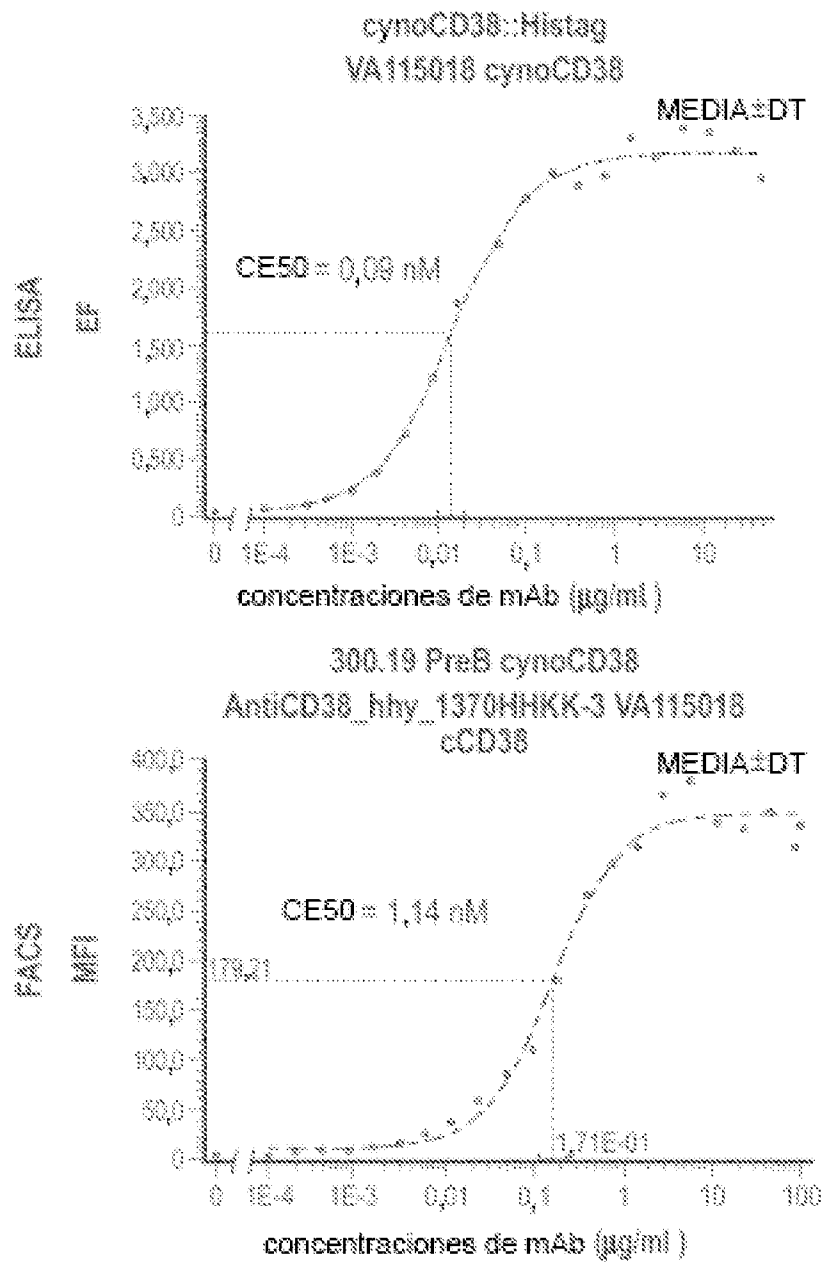


FIG. 2G (Cont.)

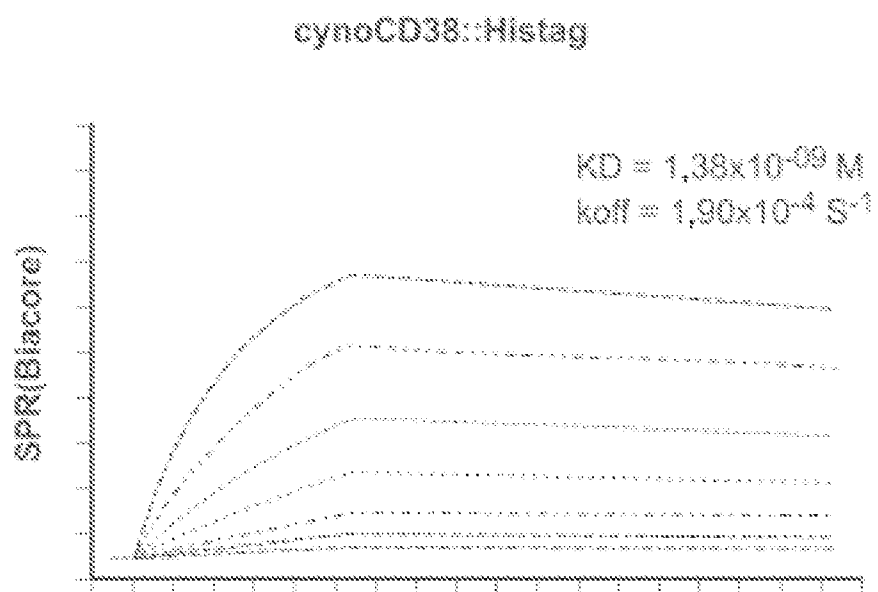
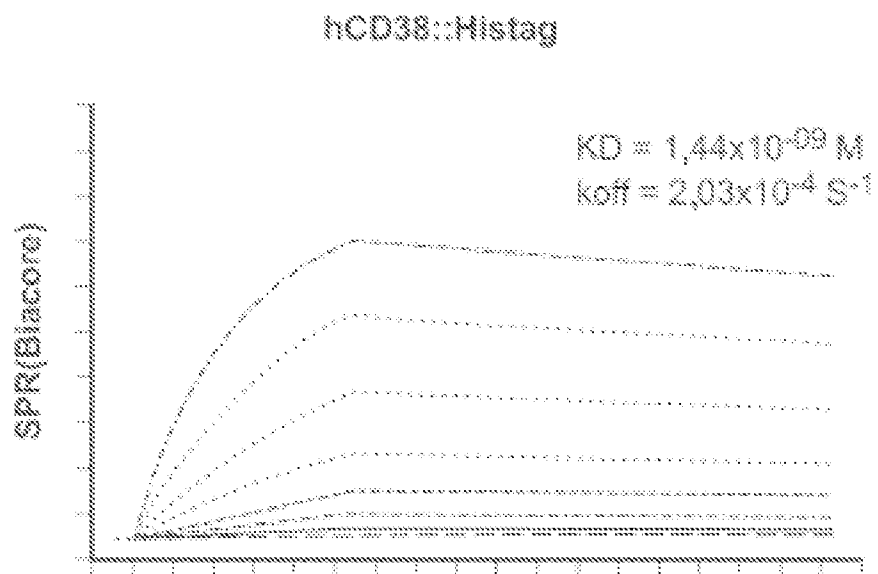


FIG. 2H

	nomenclatura INN	ELISA CE50 nM		SPR KD nM		FACS CE50 nM		Identidad de región 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	1,08	81,6%	83,9%
AntiCD38_hhy_1370-HKK-3	-umAb	0,05	0,09	1,44	1,38	2,00	1,14	98,0%	93,8%

FIG. 21

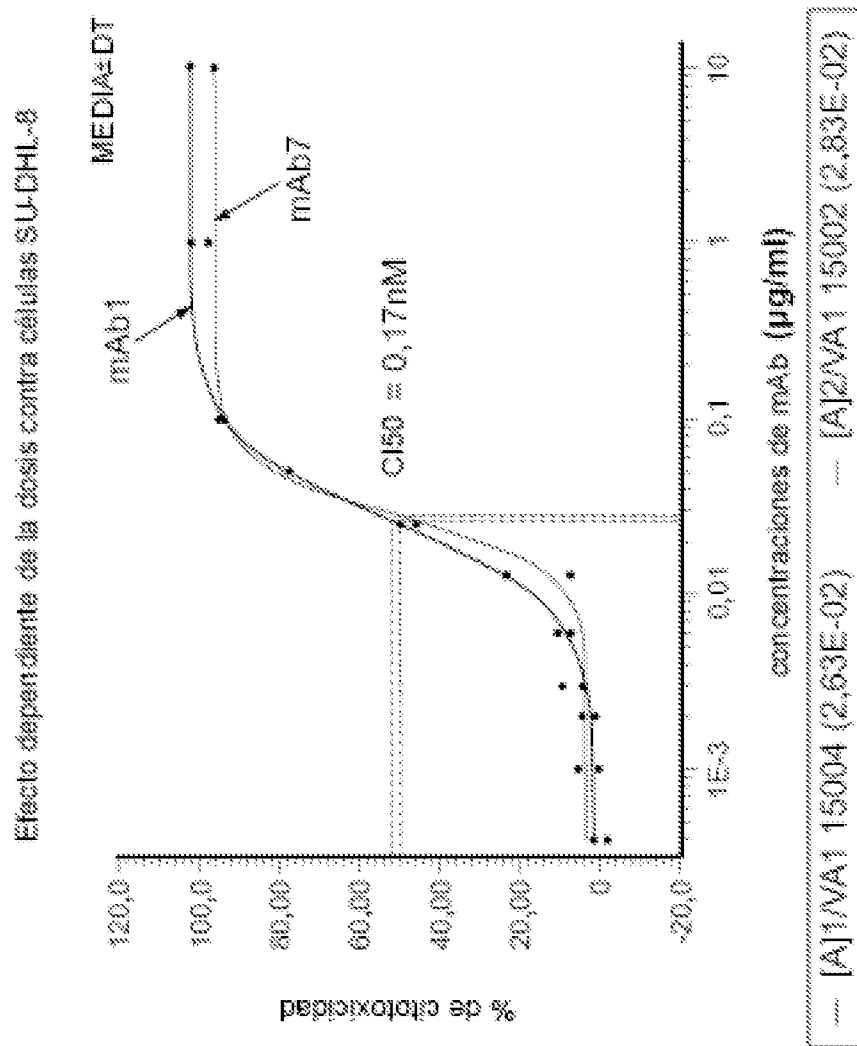


FIG. 2A

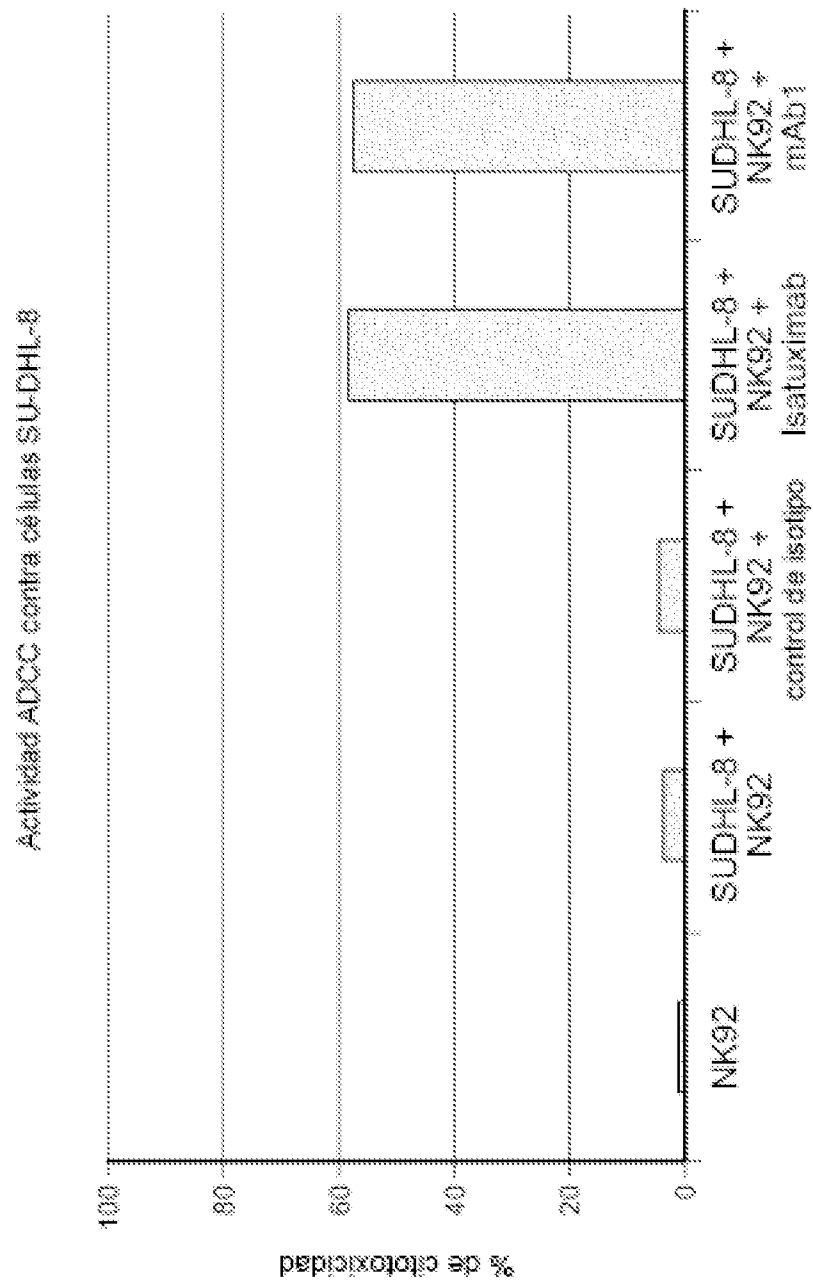


FIG. 2K

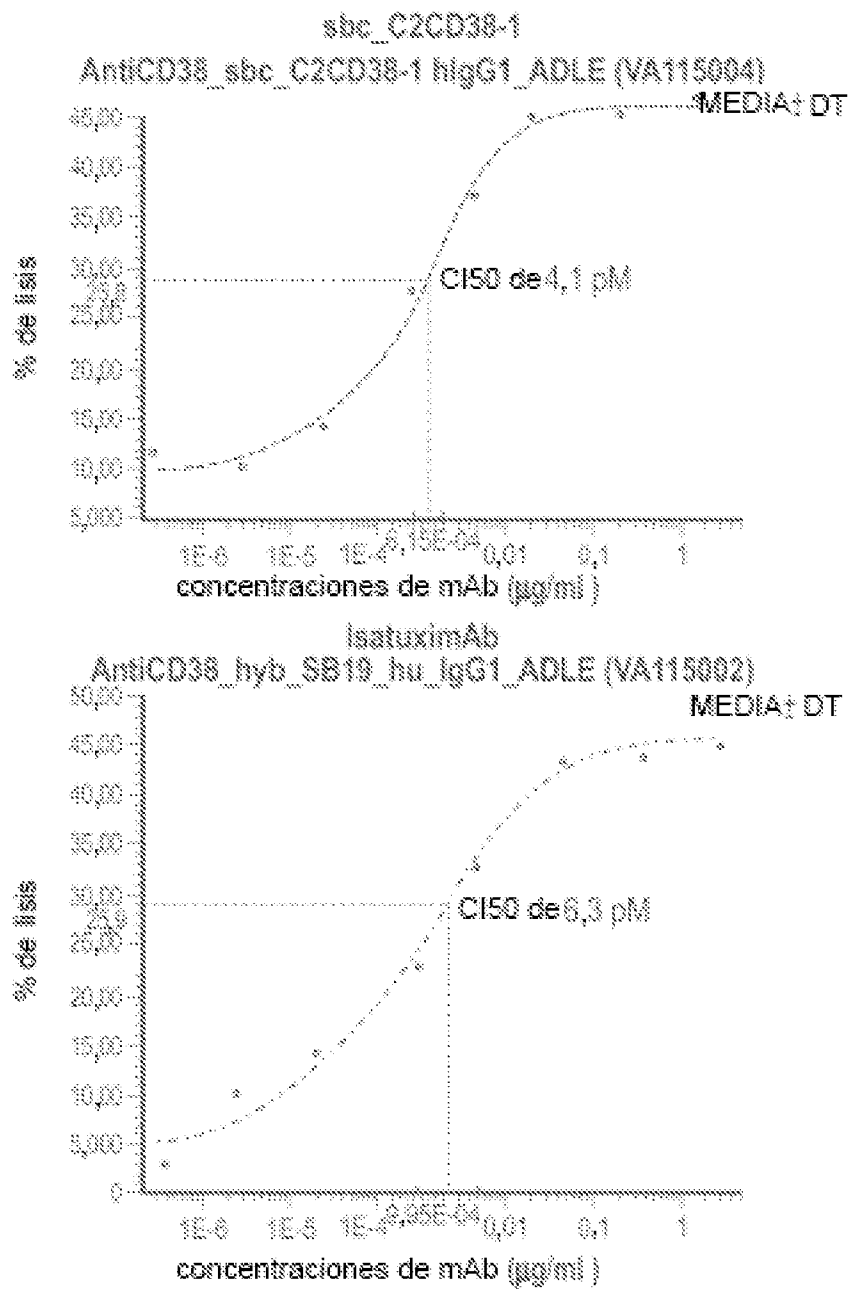


FIG. 2L

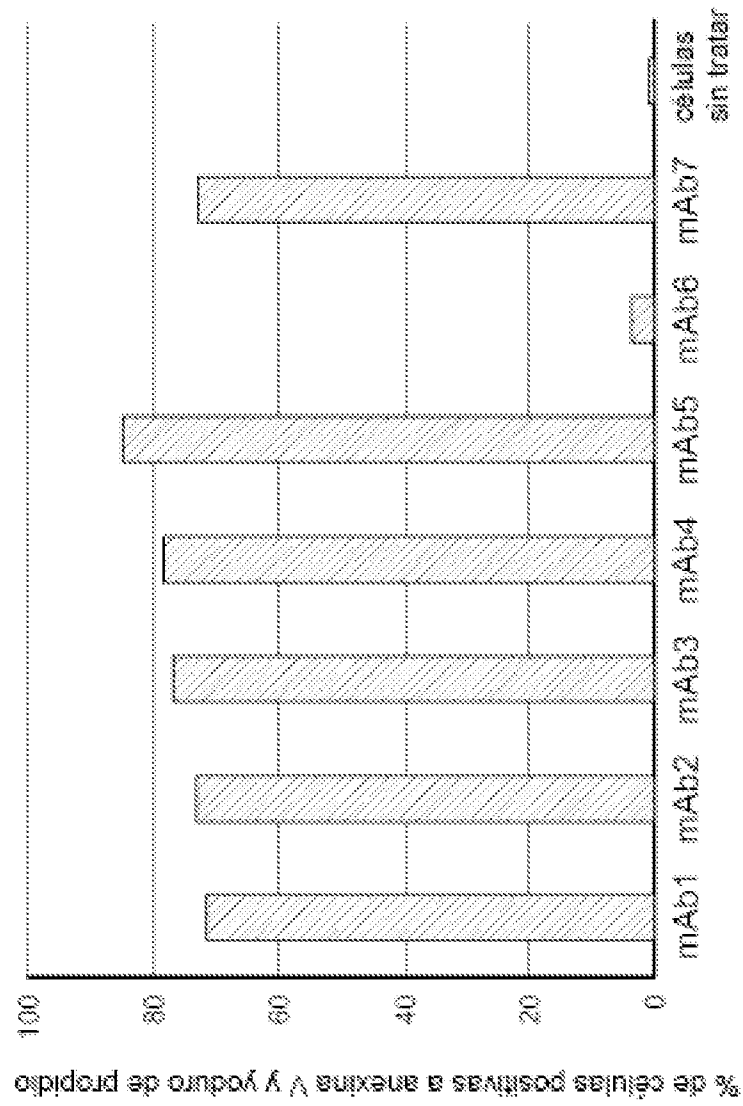


FIG. 2M

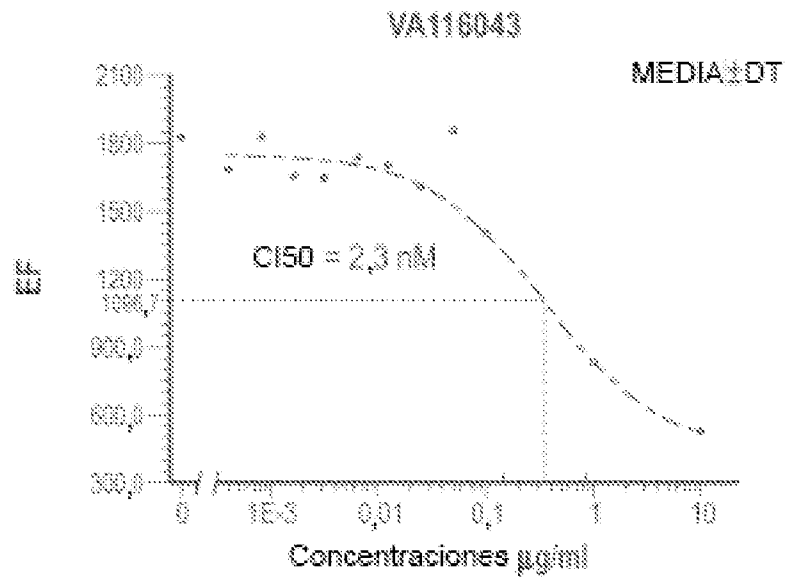


FIG. 2N

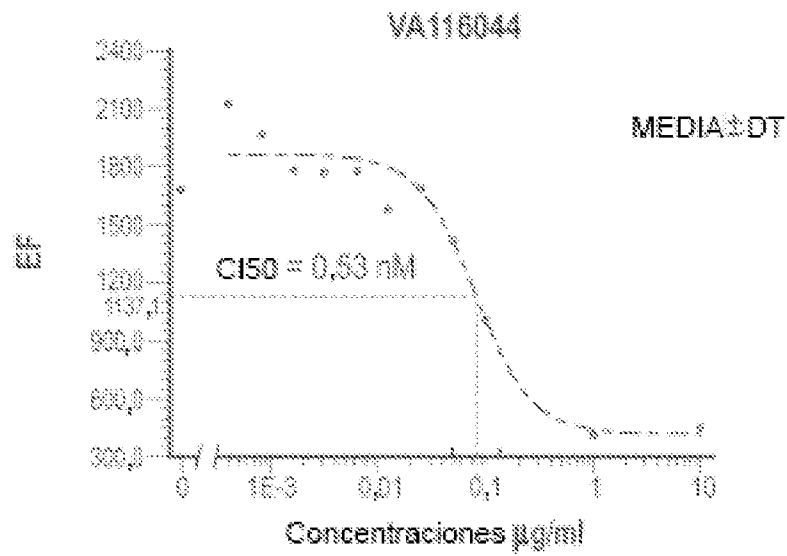


FIG. 2O

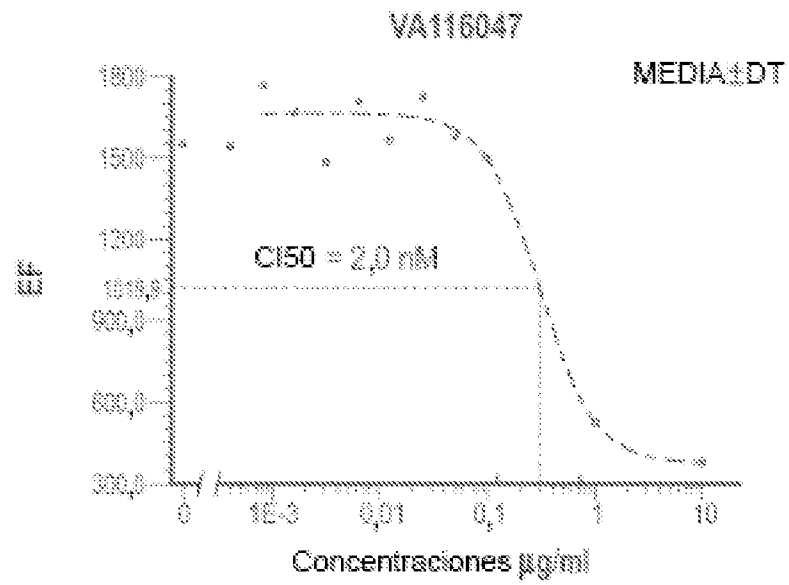


FIG. 2P

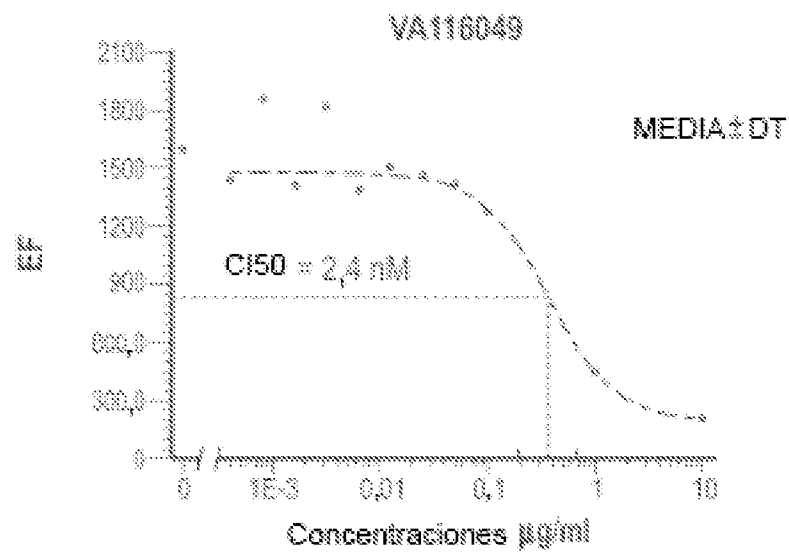


FIG. 2Q

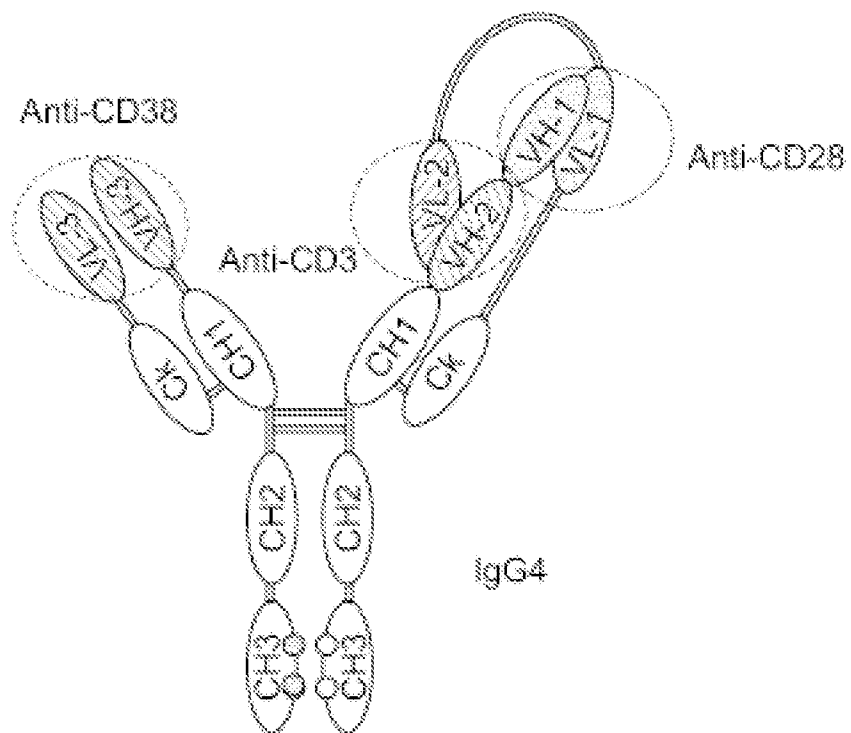


FIG. 3A

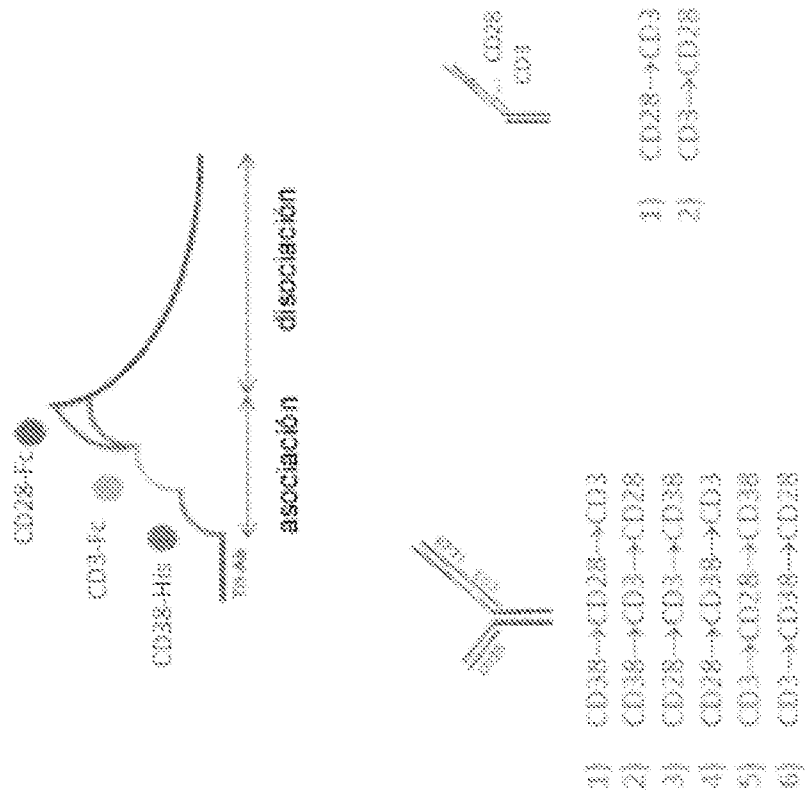


FIG. 3B

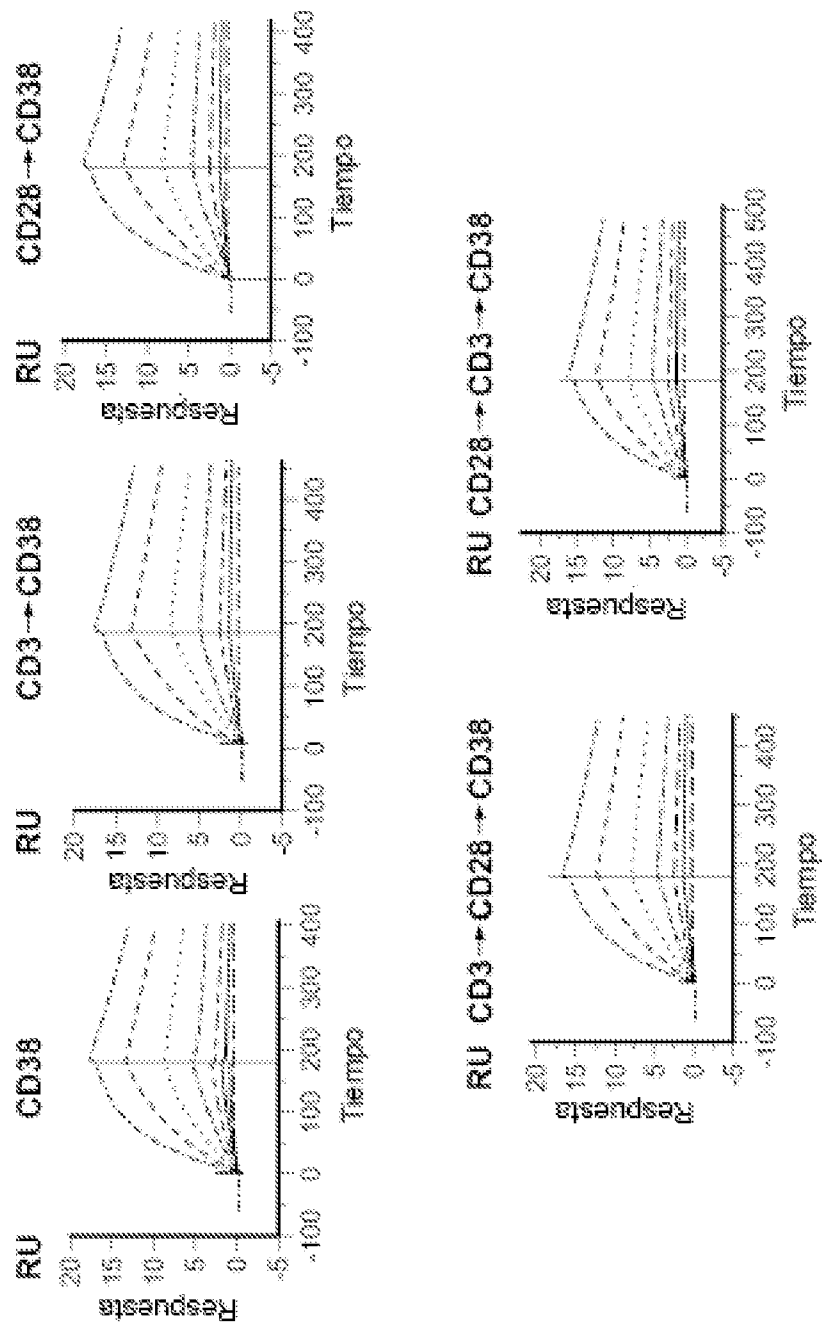


FIG. 3C

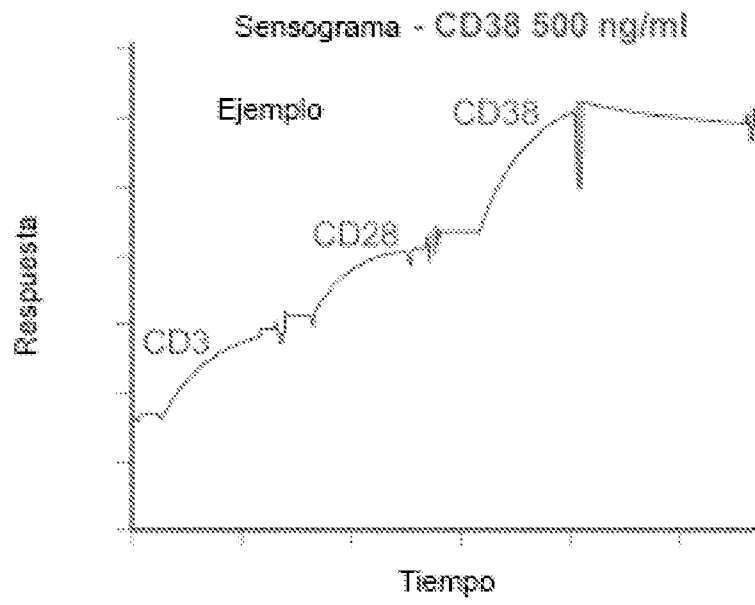


FIG. 4

Afinidad de WT TsAb por dianas individuales (K_D redondeada al entero)

TsAb	CD38	CD28	CD3	Clasif. orden de afinidad
CD38 _{SB19} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	2 nM	3 nM	23 nM	• Unión a CD38: MsAb ≈ TsAb
CD38 _{SB19} CD28 _{ovn} CD3 _{mid}	2 nM	17 nM	19 nM	
CD38 _{VH1} CD28 _{sup} CD3 _{mid/low}	4/6 nM	2/4 nM	21/76 nM	• Unión a CD28: MsAb > TsAb ≥ BsAb
CD38 _{VH1} CD28 _{ovn} CD3 _{mid/low}	4/6 nM	18/34 nM	23/59 nM	
CD38 _{HHY1370} CD28 _{sup} CD3 _{mid}	1 nM	5 nM	48 nM	• Unión a CD3: MsAb ≈ BsAb ≈ TsAb
CD38 _{HHY1370} CD28 _{ovn} CD3 _{mid}	1 nM	19 nM	44 nM	

Impacto de unión multidiana a CD38_{SB19}CD28_{sup}CD3_{mid}

Estado de TsAb	CD38	CD28	CD3	Comentarios
Una sola diana	2 nM	3 nM	23 nM	Cinética rápida de unión a CD3 cuando están presentes todas las dianas
Todas las dianas	2 nM	4 nM	19 nM	

FIG. 5

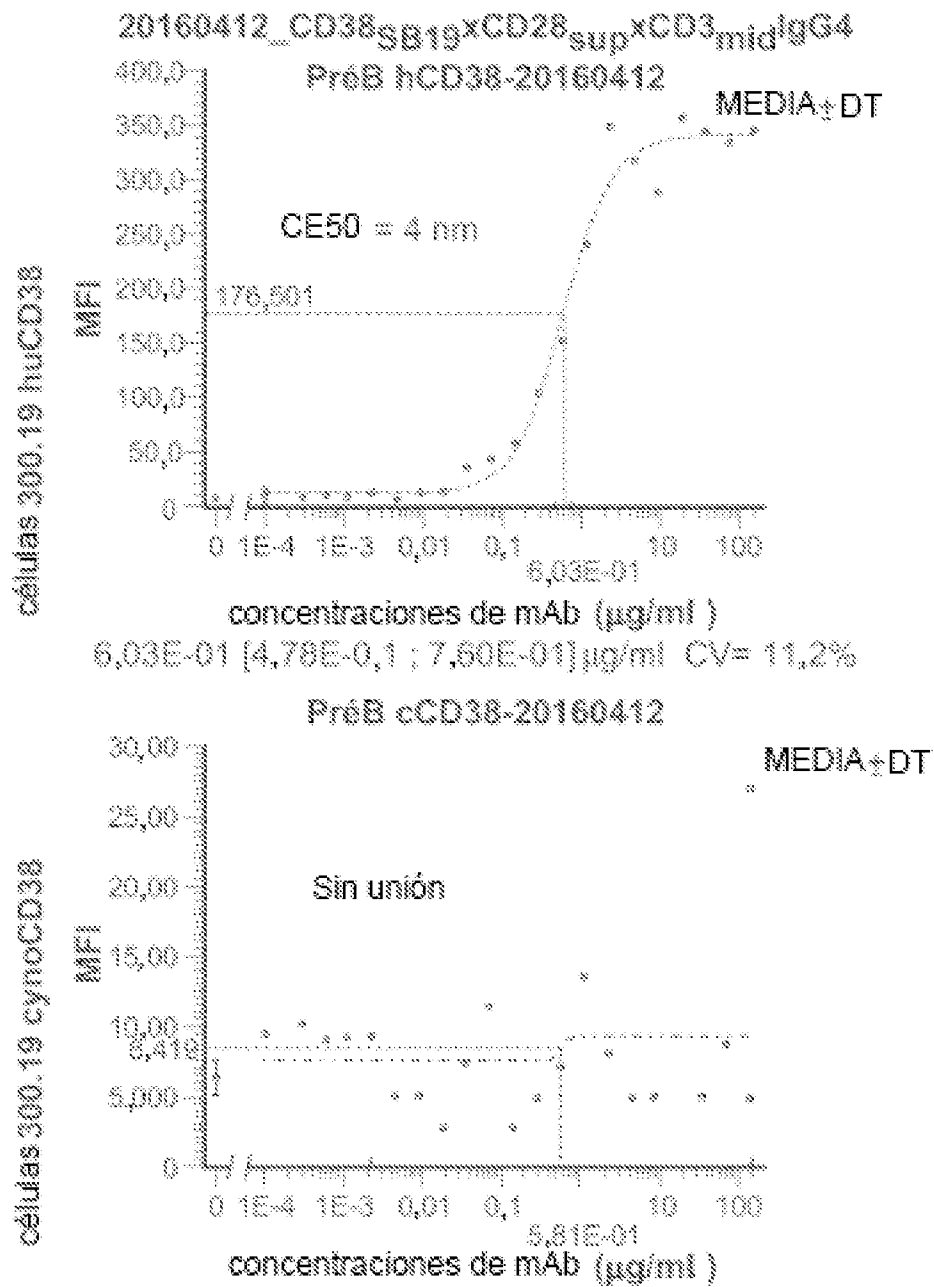


FIG. 6A

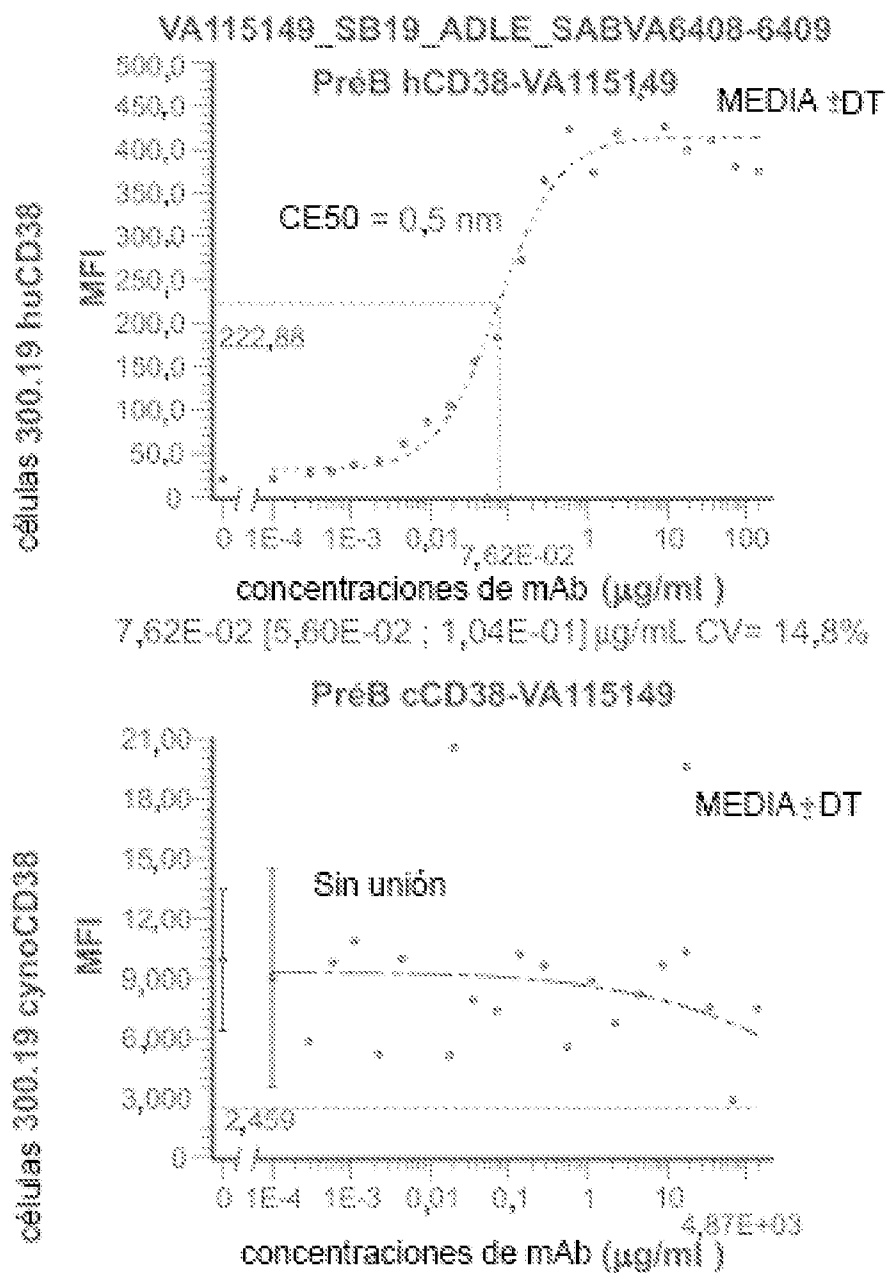


FIG. 6A (Cont.)

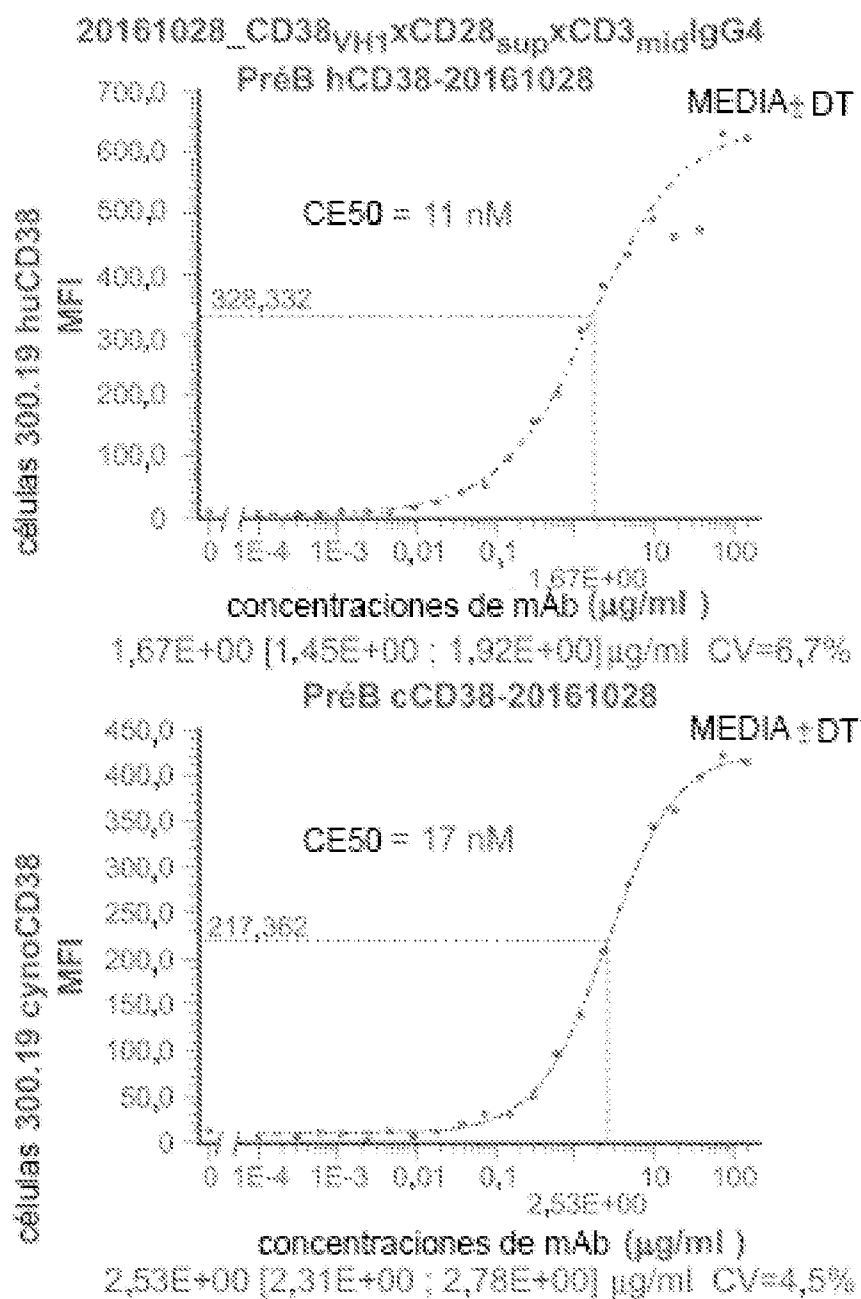


FIG. 6B

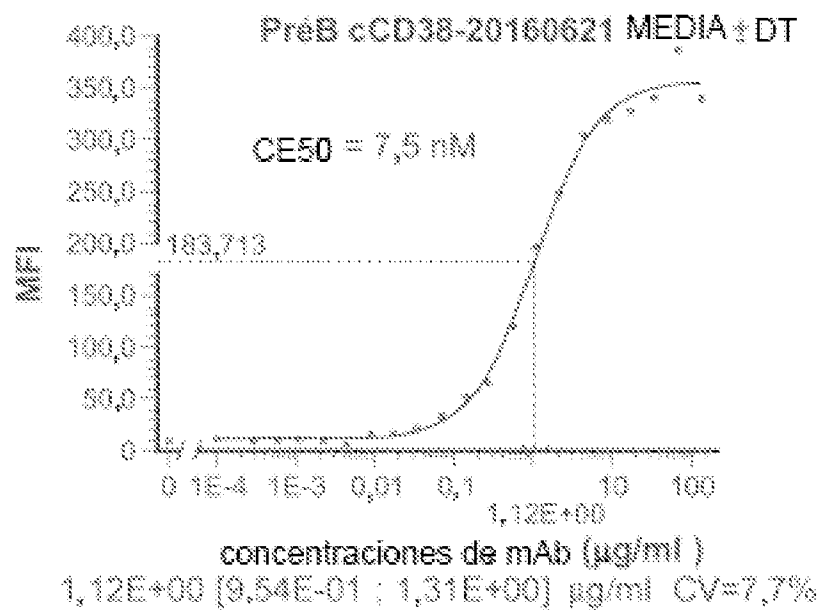
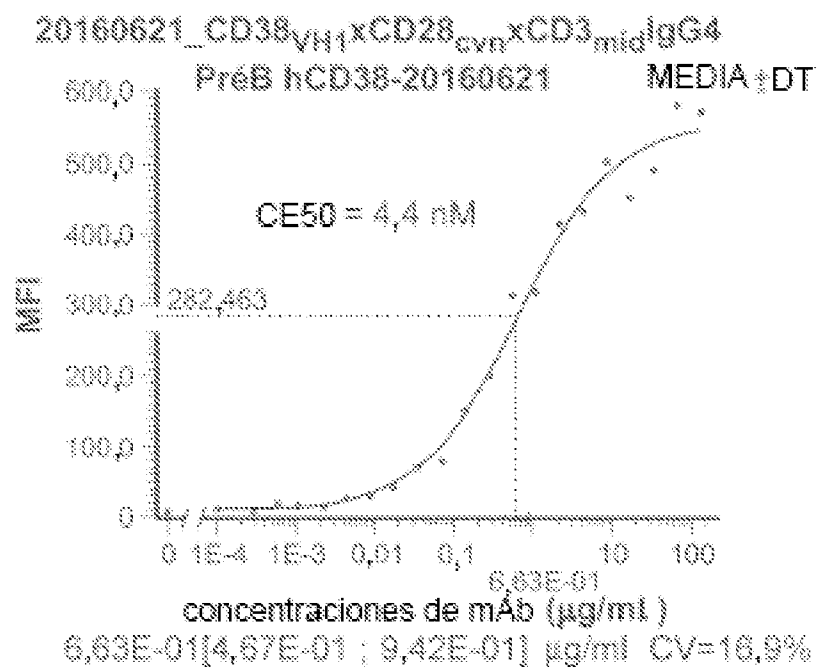


FIG. 6C

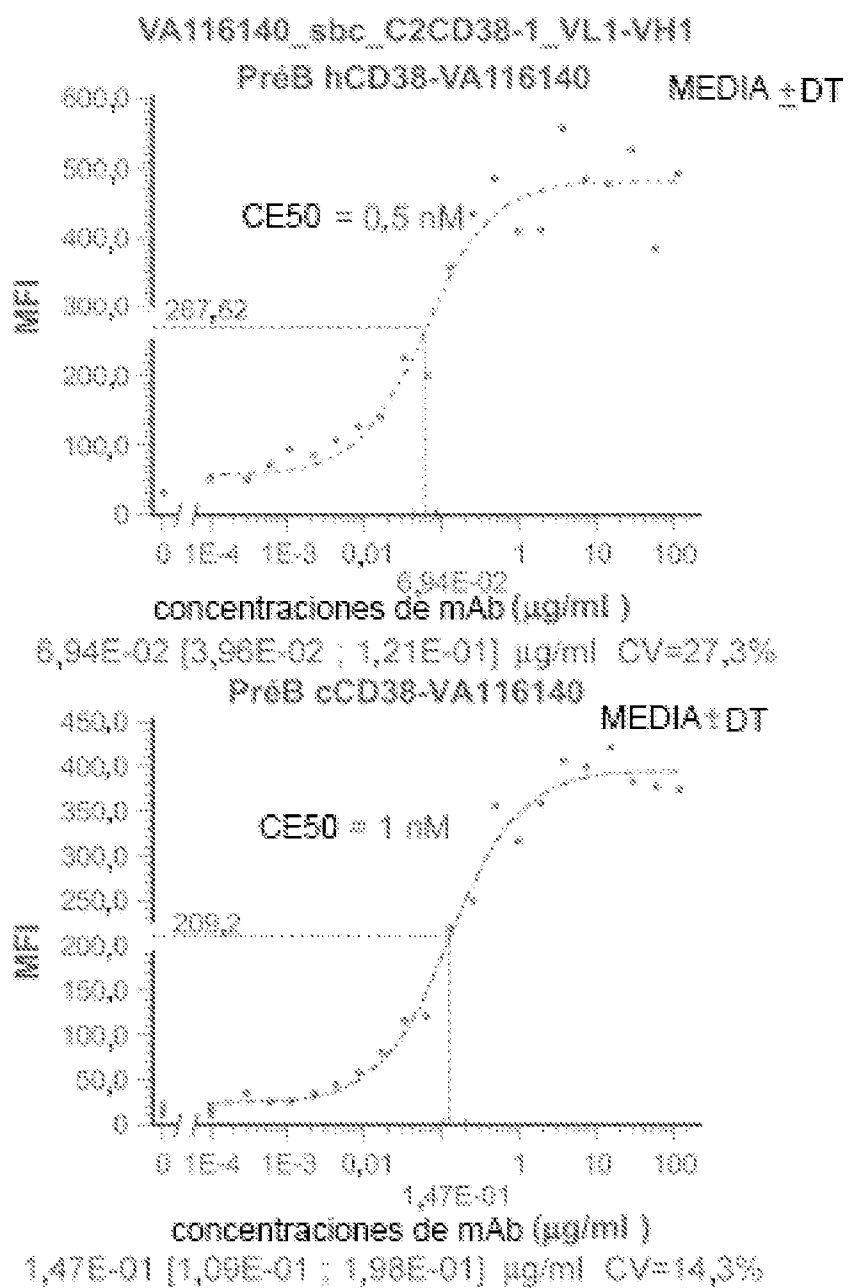


FIG. 6D

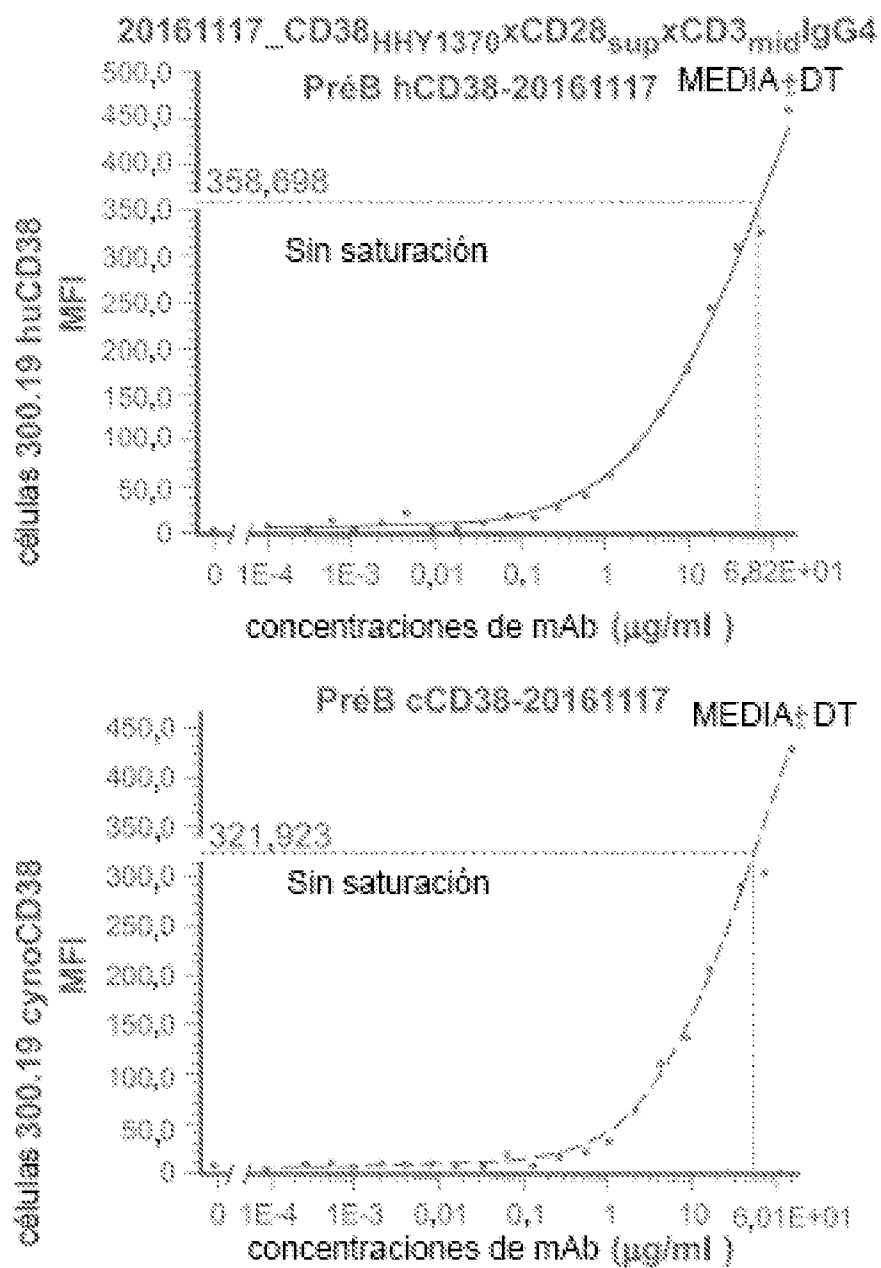


FIG. 6E

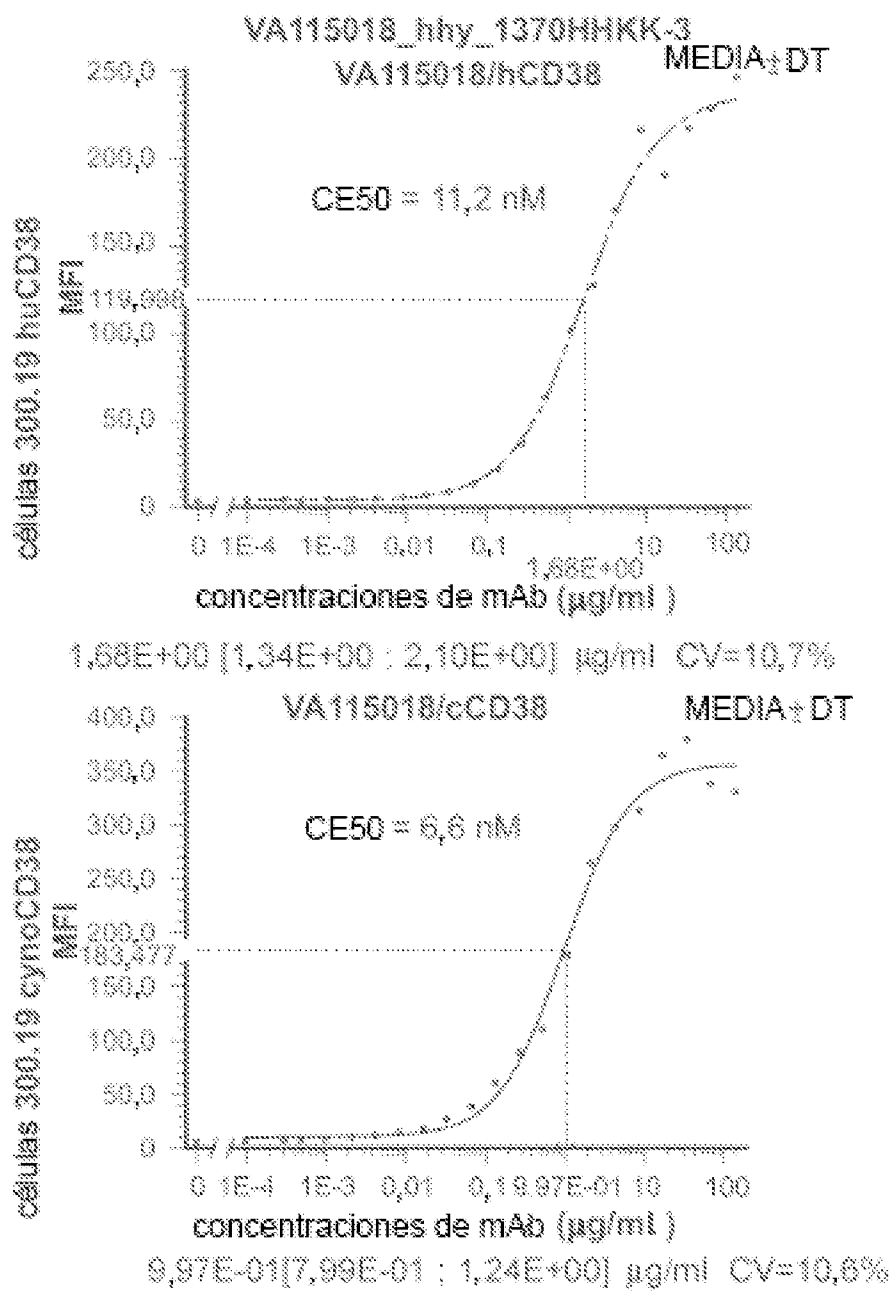


FIG. 6E (Cont.)

YsAb	² valor de KD contra proteína rec. por SPR (nM)	³ valor de KD aparente contra células rec. por FACS (nM)
CD18 _{sup} CD28 _{sup} CD3 _{sup}	2	4
CD18 _{sup} CD28 _{sup} CD3 _{sup} CD4 _{sup}	4/6	1.1
CD18 _{sup} CD28 _{sup} CD3 _{sup} CD4 _{sup} CD8 _{sup}	4/6	4.4
CD18 _{sup} CD28 _{sup} CD3 _{sup} CD4 _{sup} CD8 _{sup} CD137 _{sup}	1	no pudo estimarse valor preciso de CE50 (sin saturación)

FIG. 6F

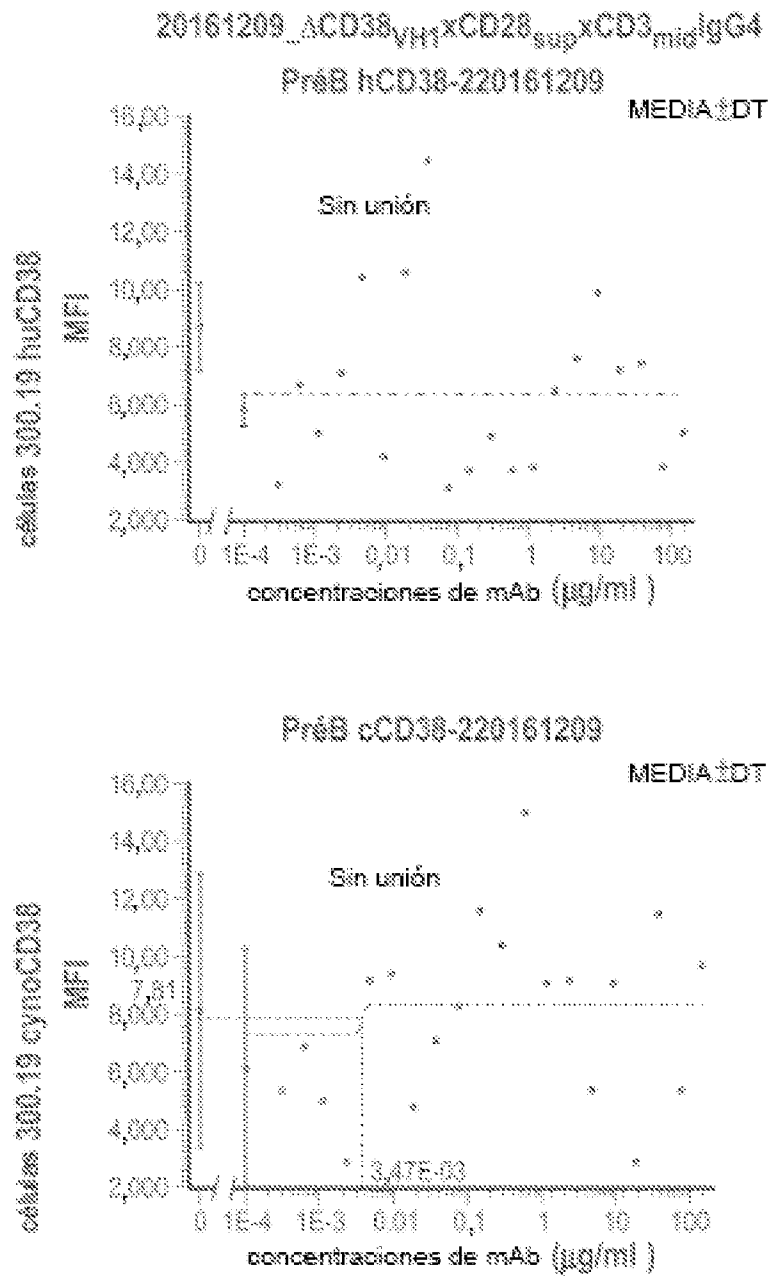
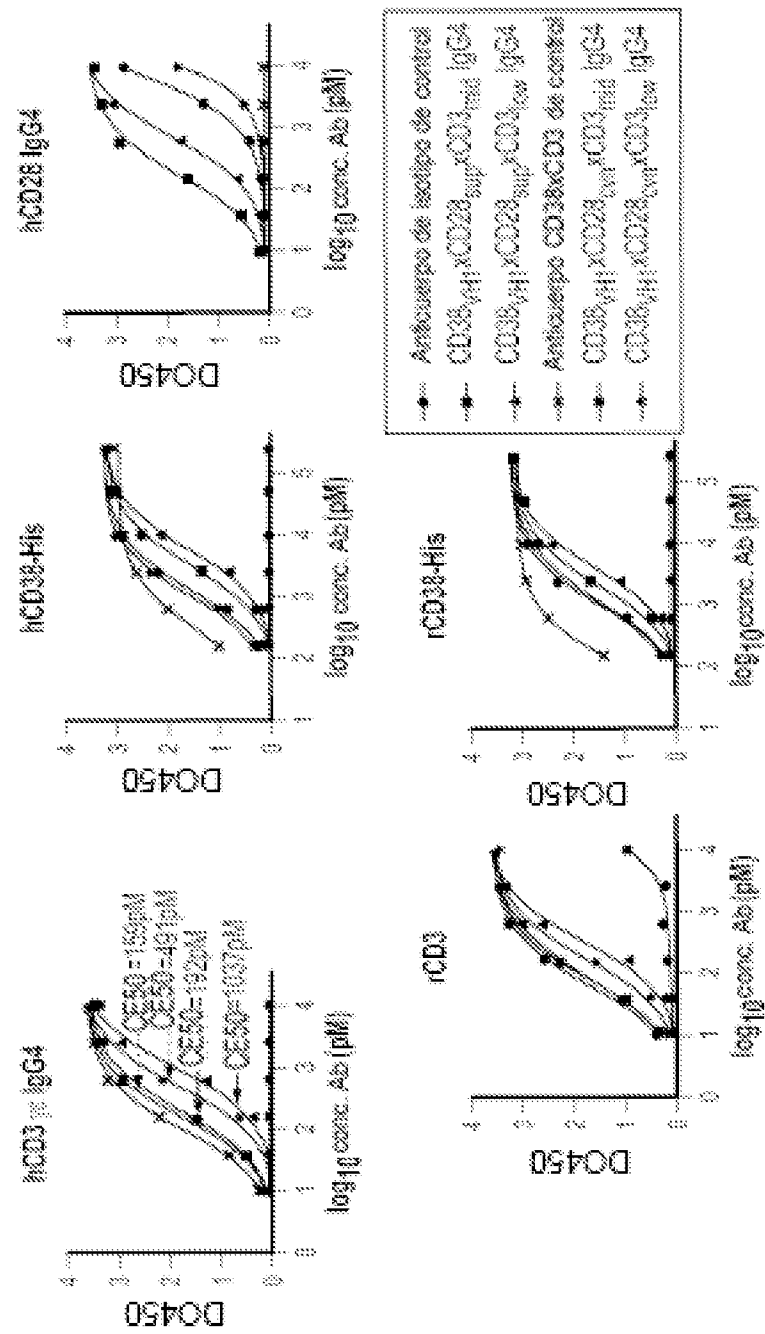


FIG. 6G



MC-3

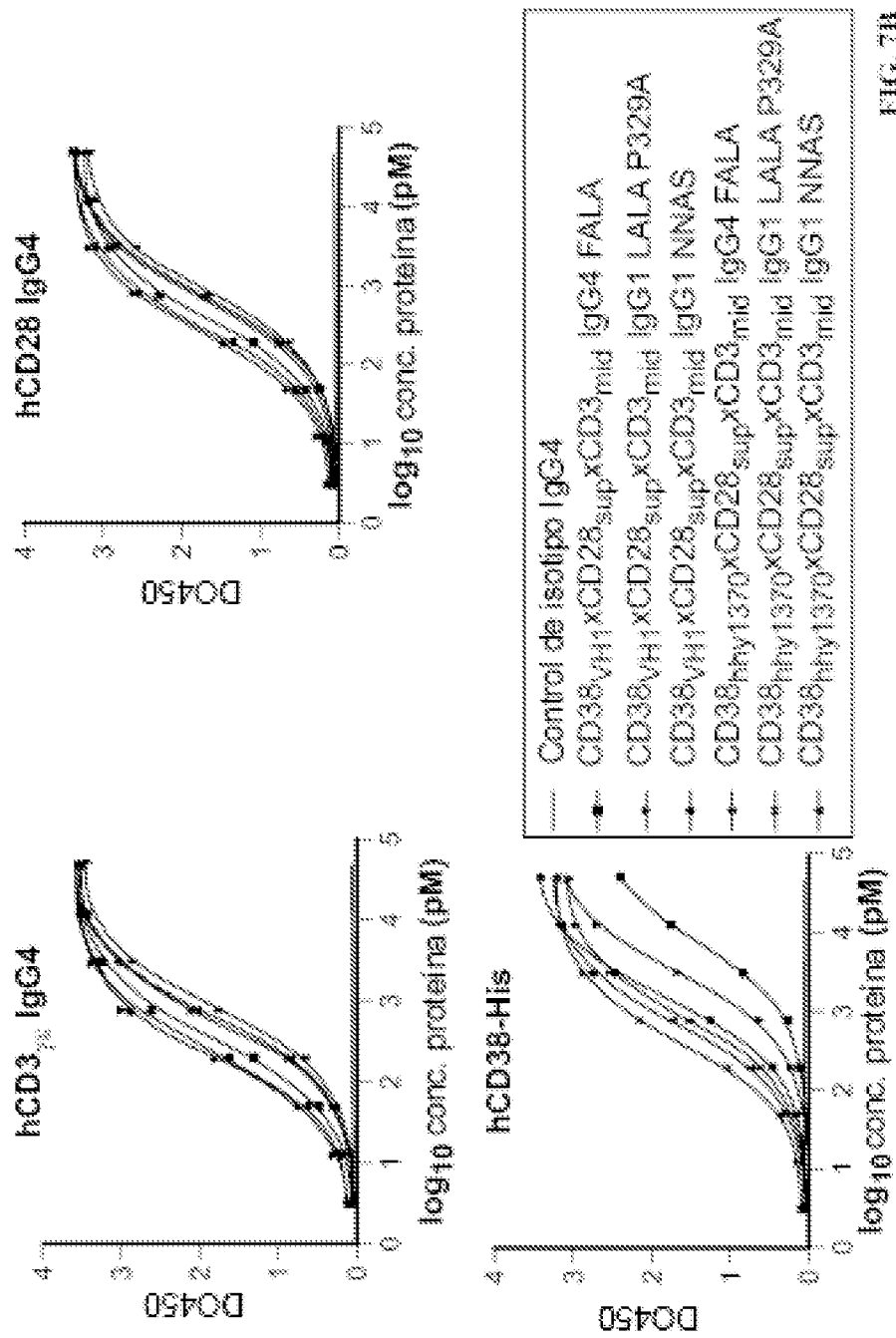


FIG. 7B

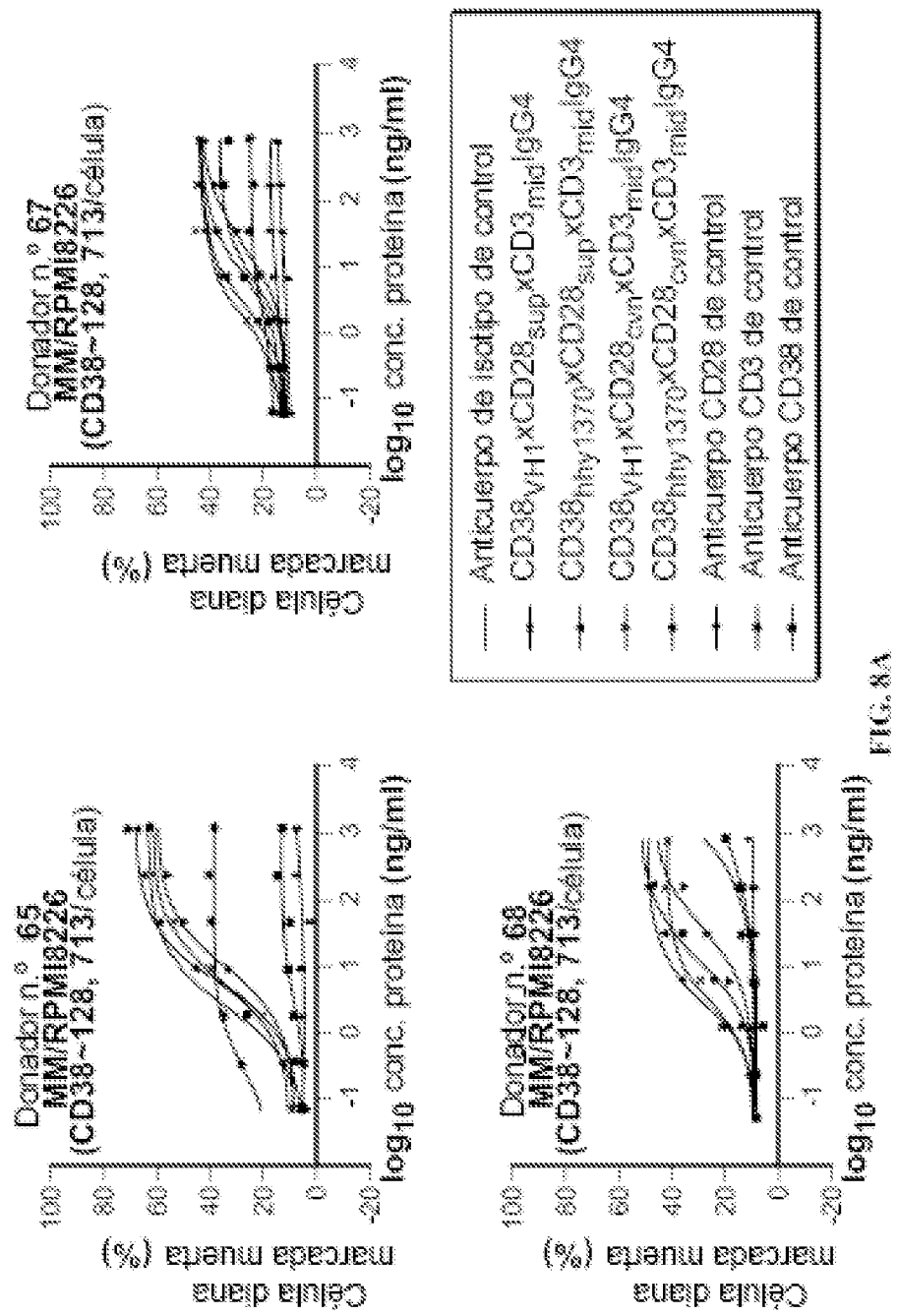
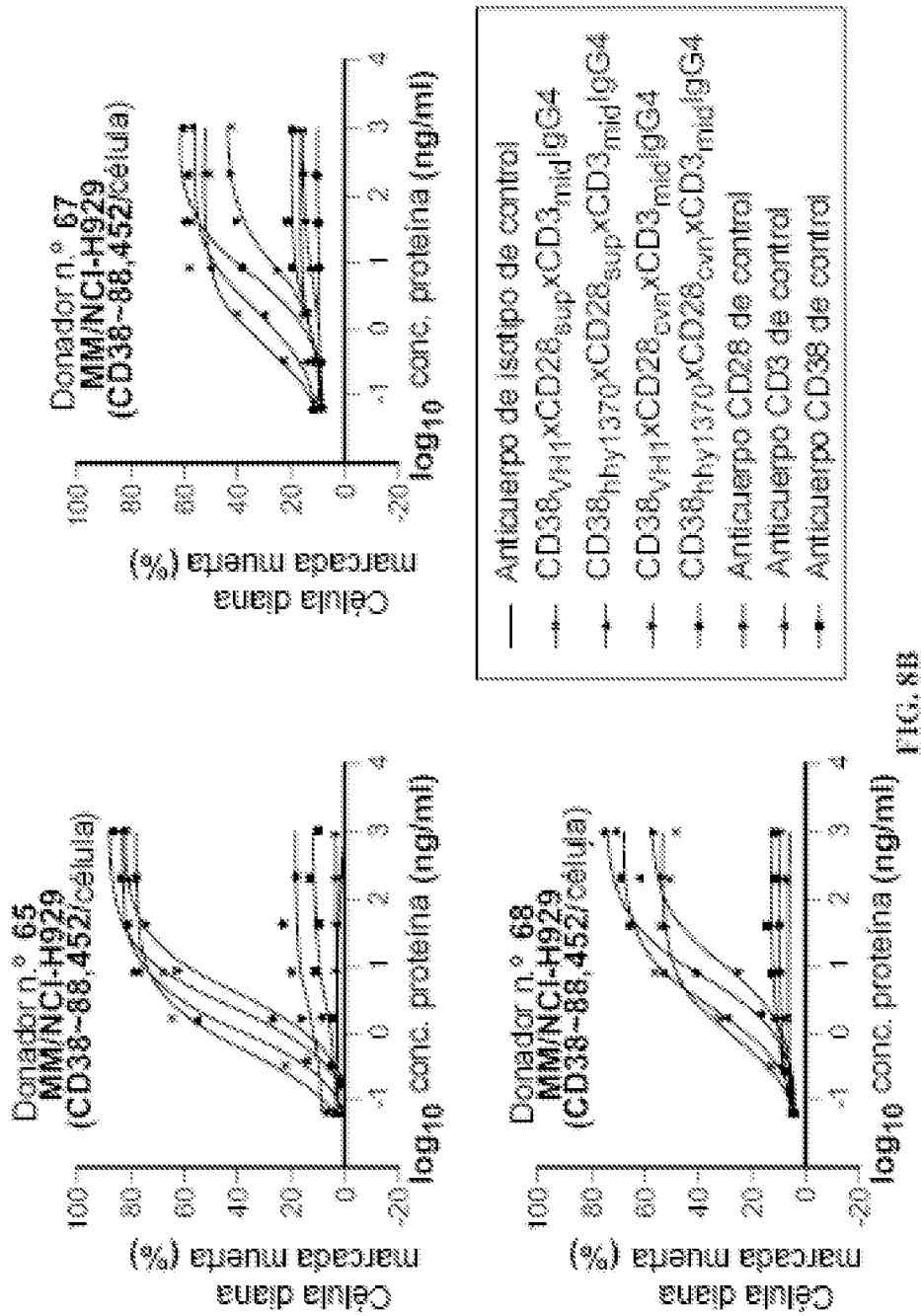


FIG. 8A



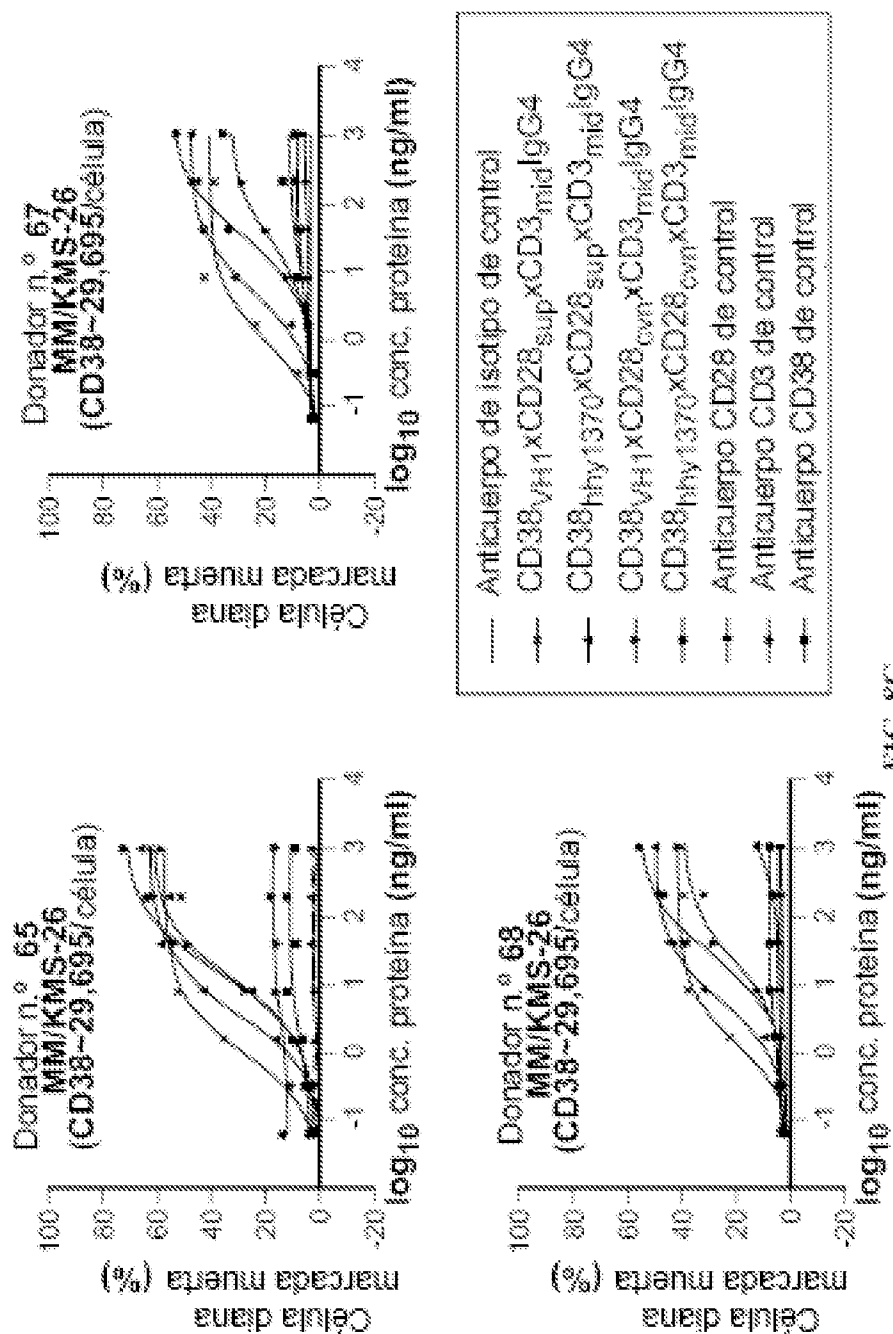


FIG. 8C

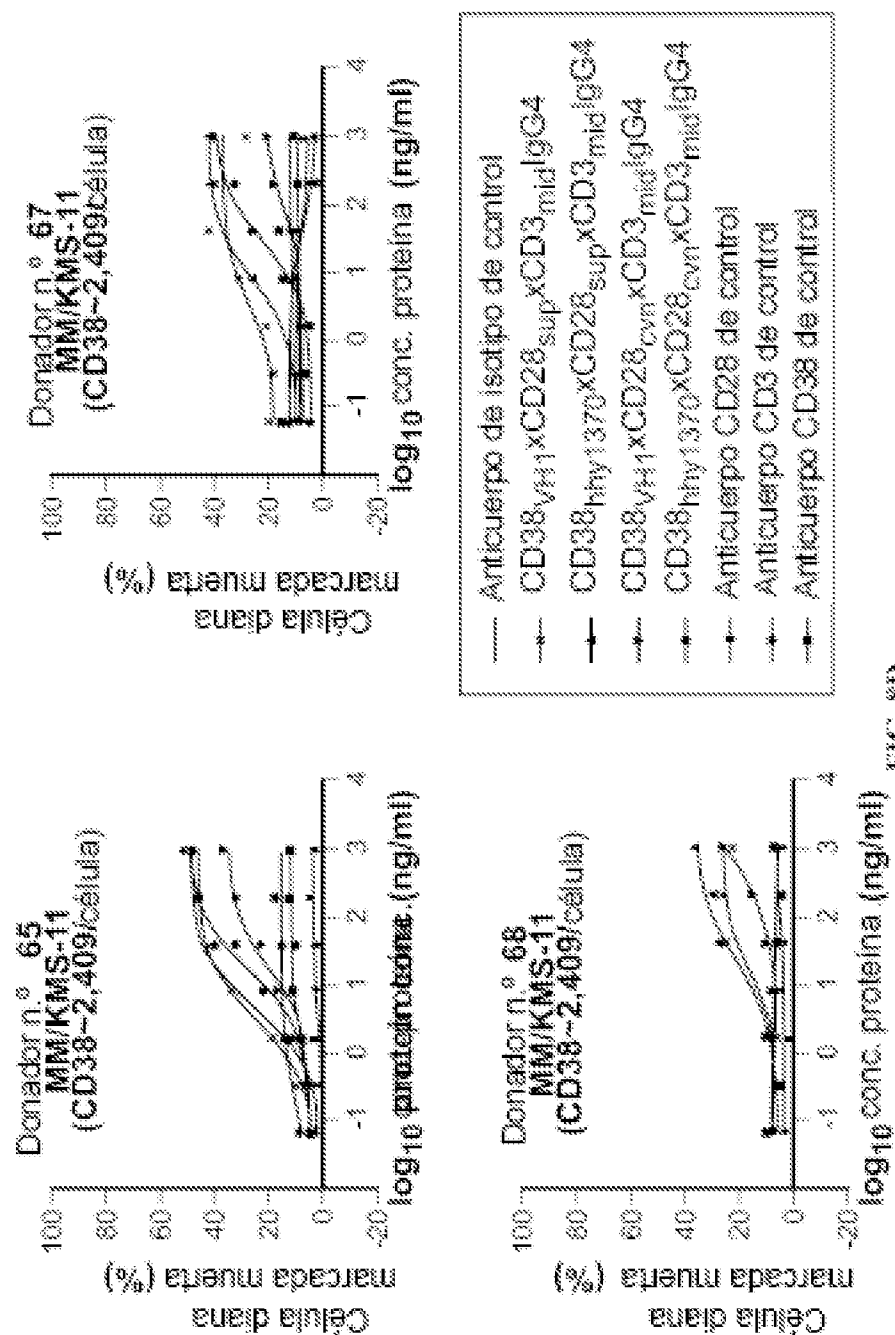


FIG. 8D

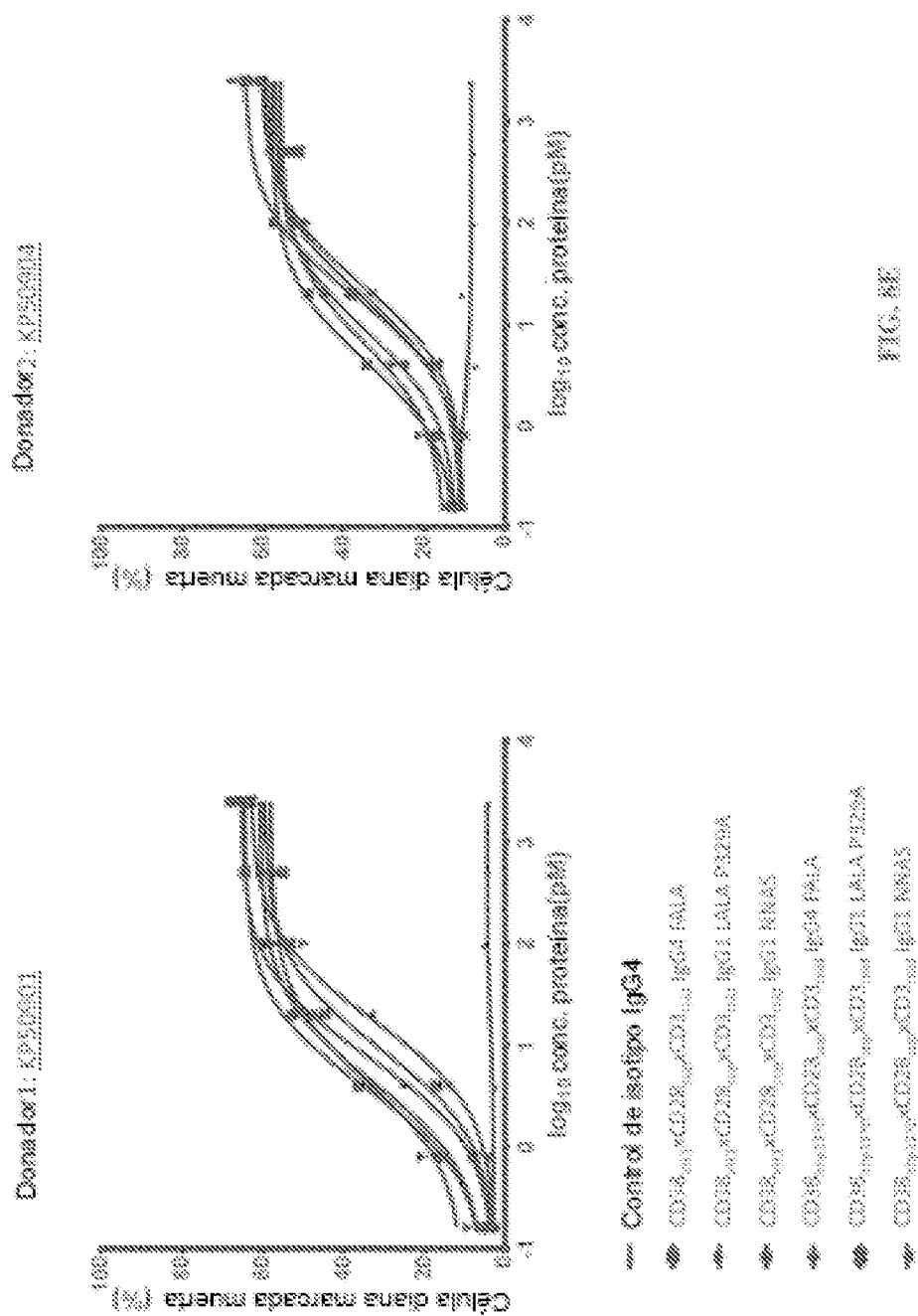


FIG. 5E

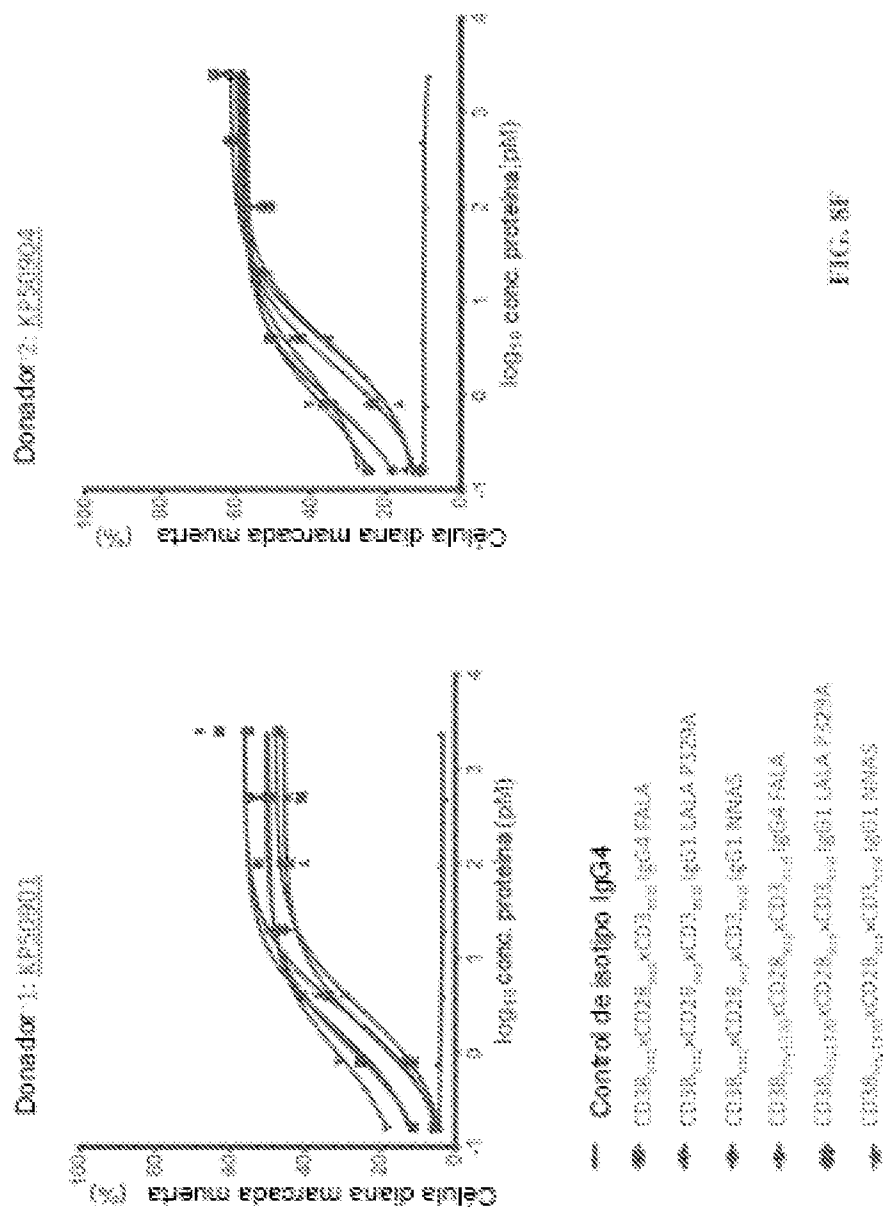


FIG. 8F

FIG. 9B

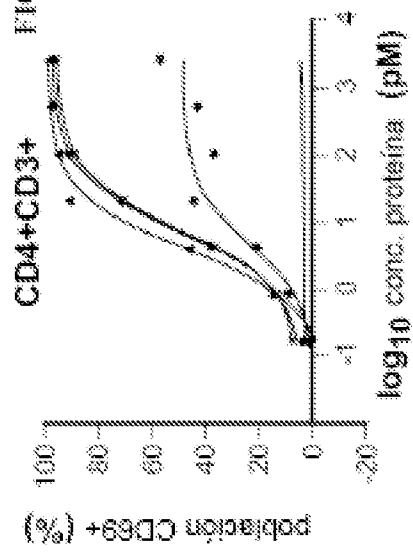


FIG. 9A

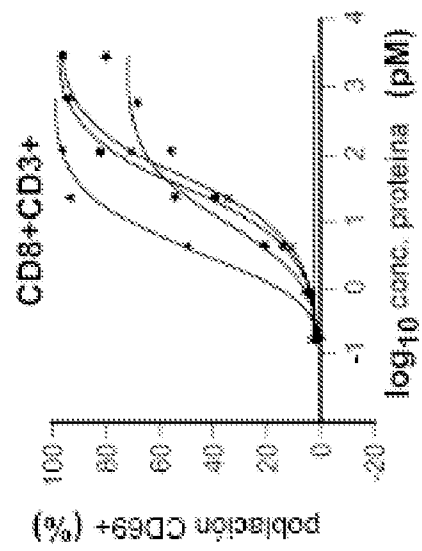
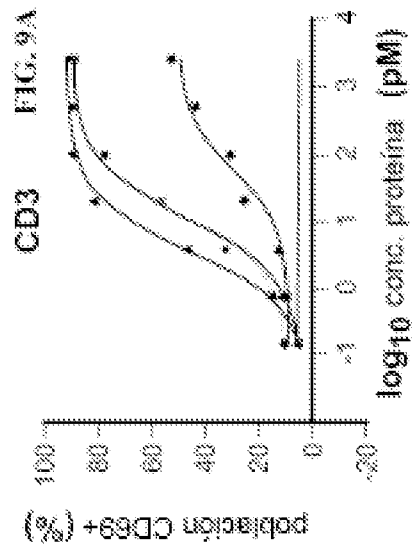
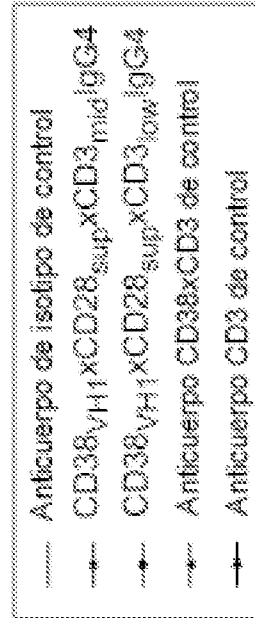
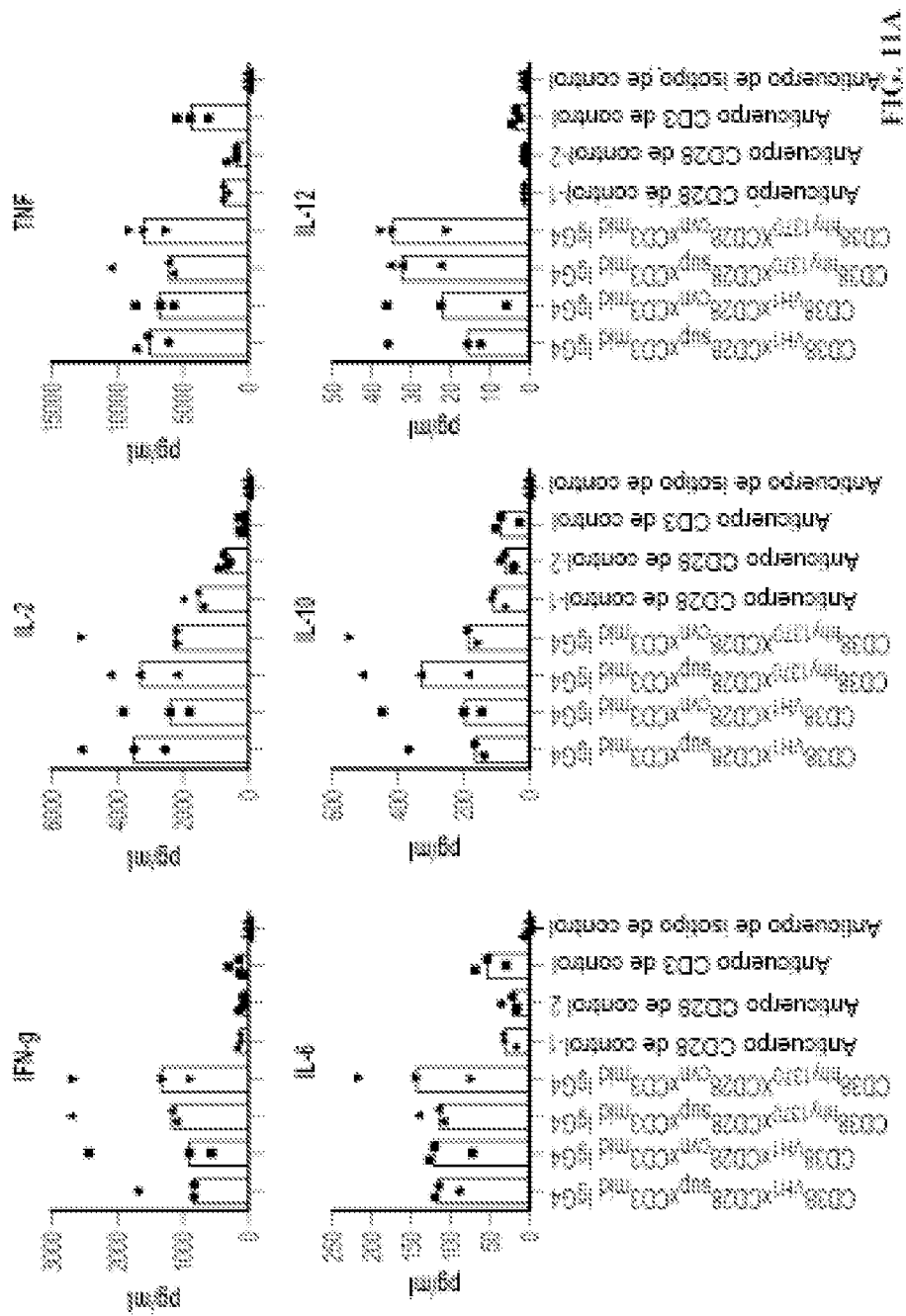
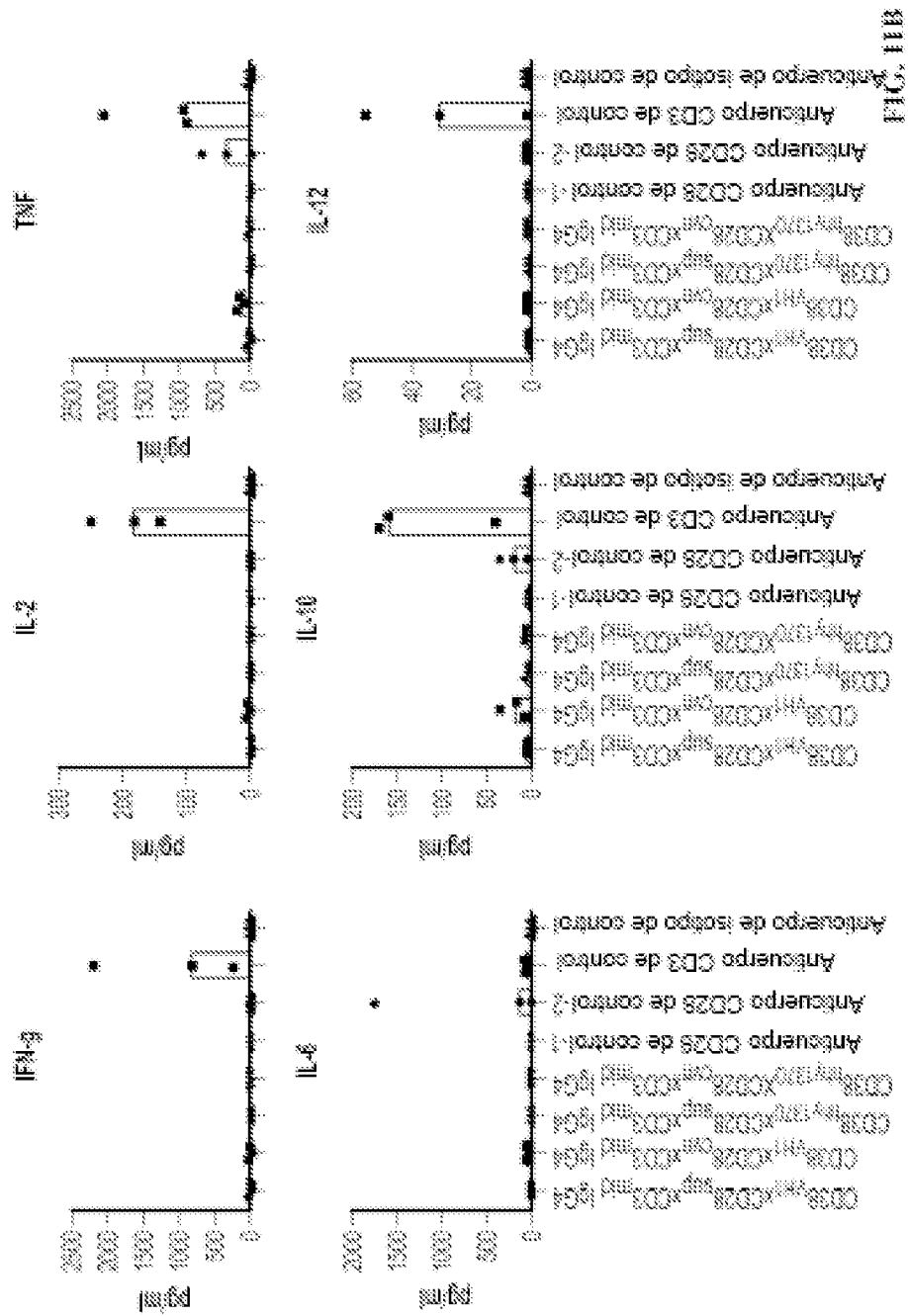


FIG. 10







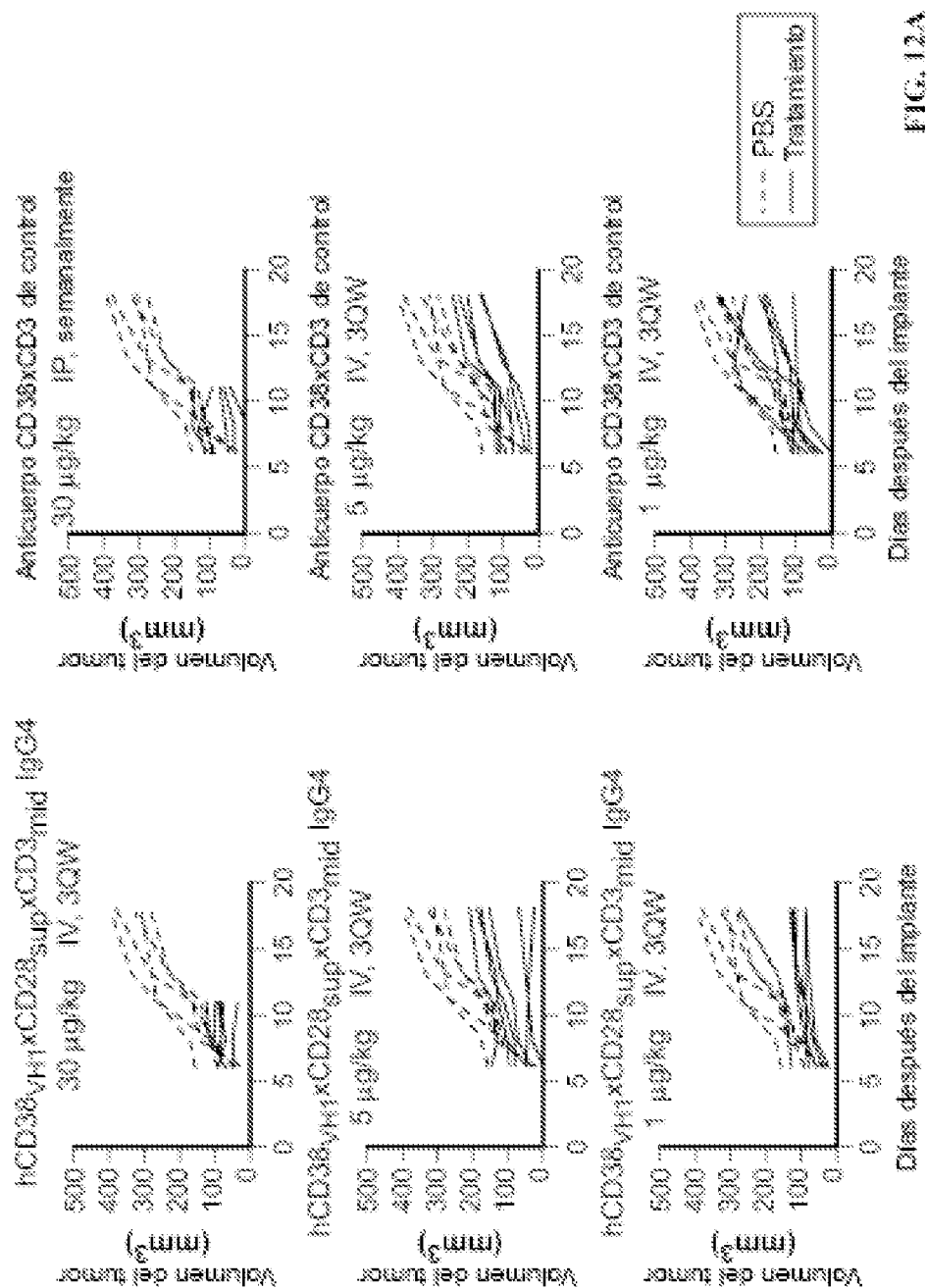


FIG. 12A

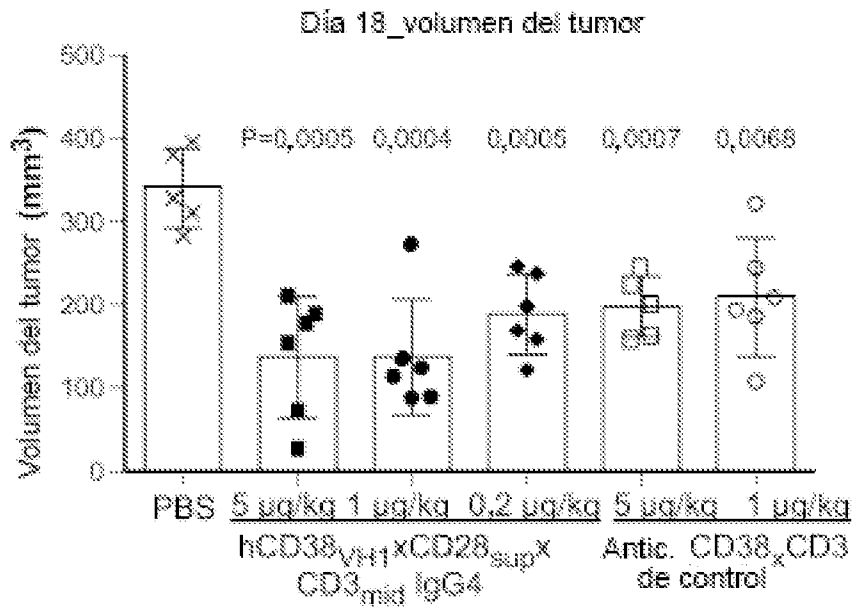


FIG. 12B

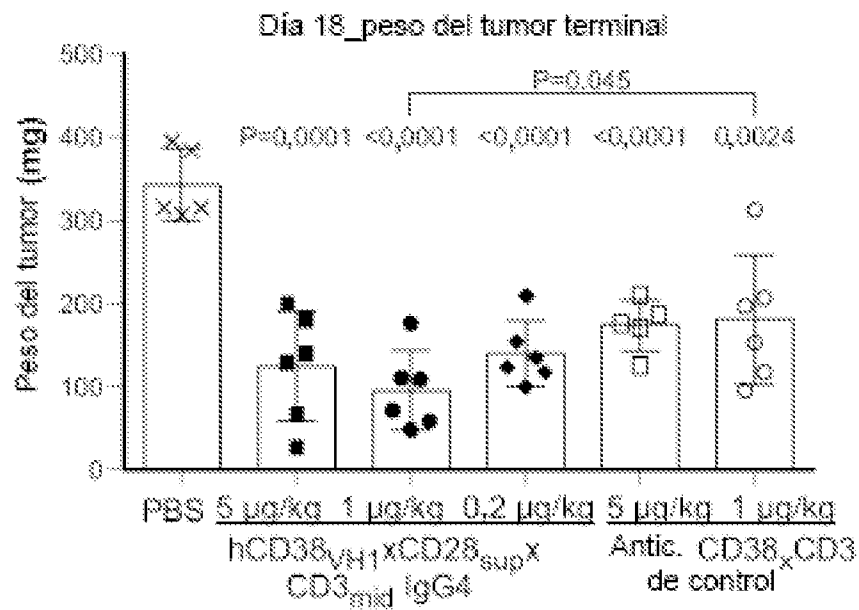


FIG. 12C

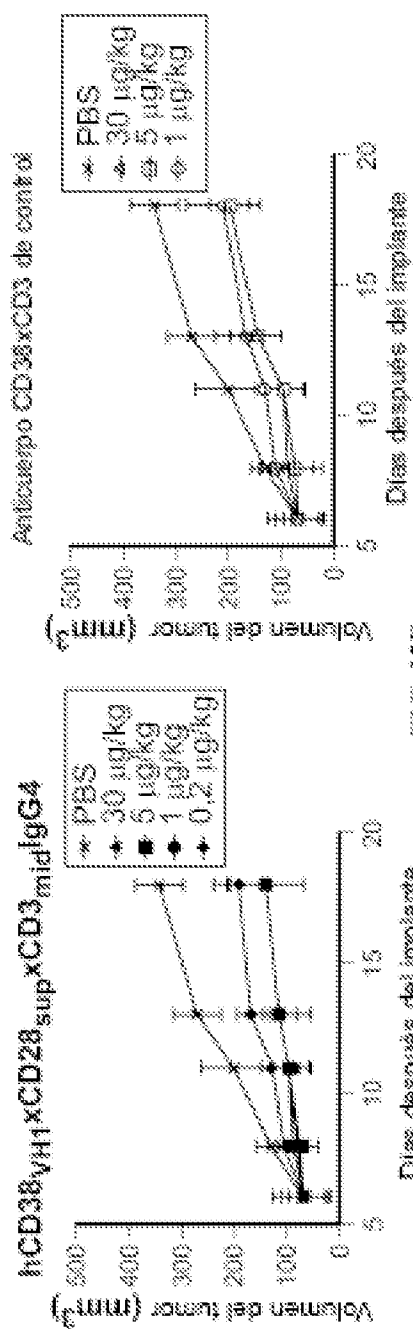


FIG. 12D

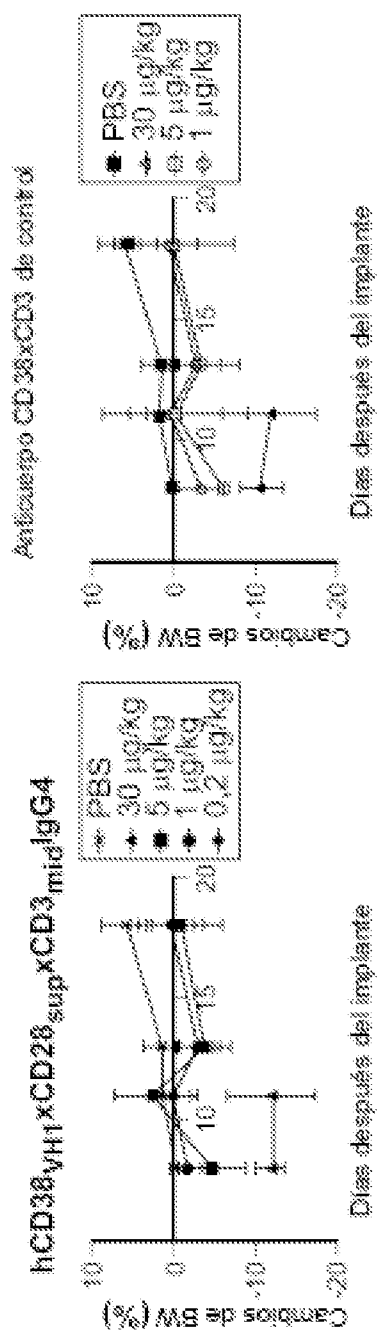


FIG. 12E

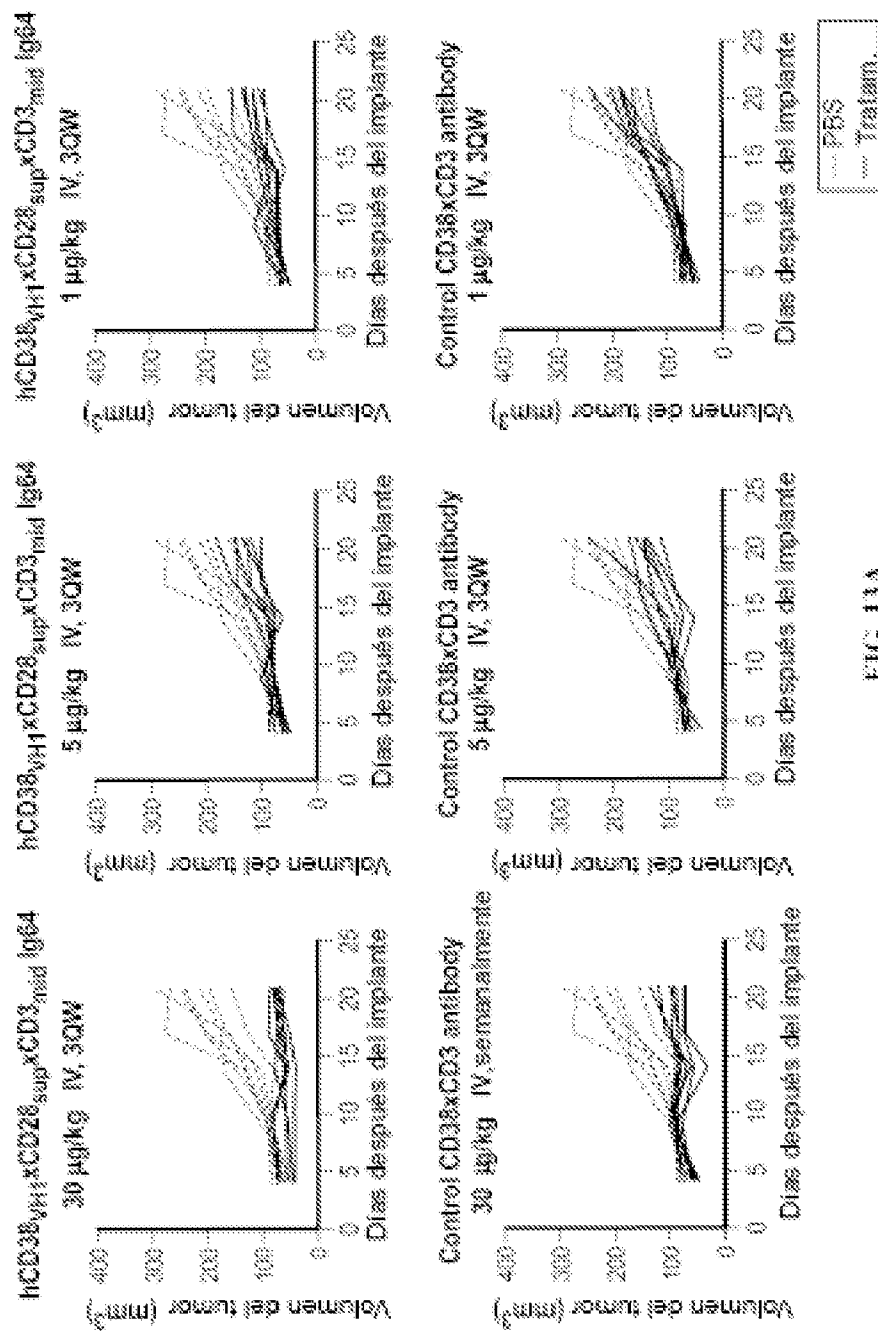


FIG. 13A

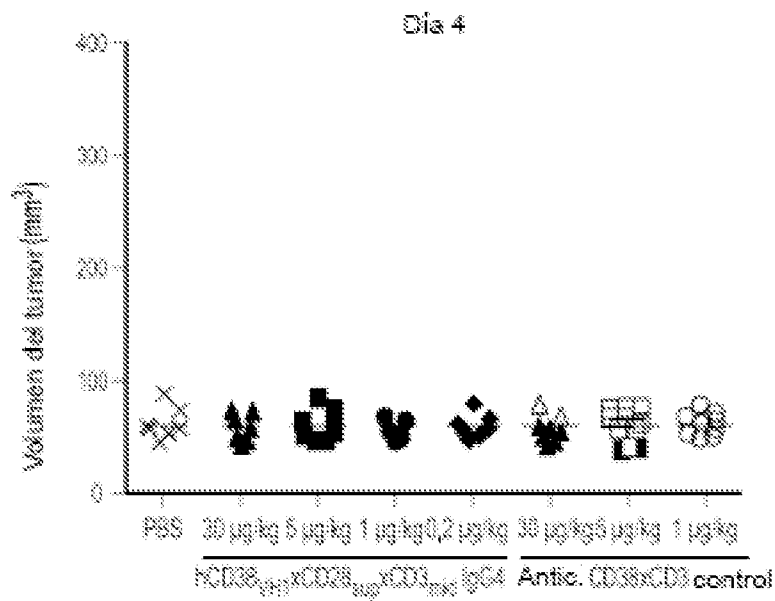


FIG. 13B

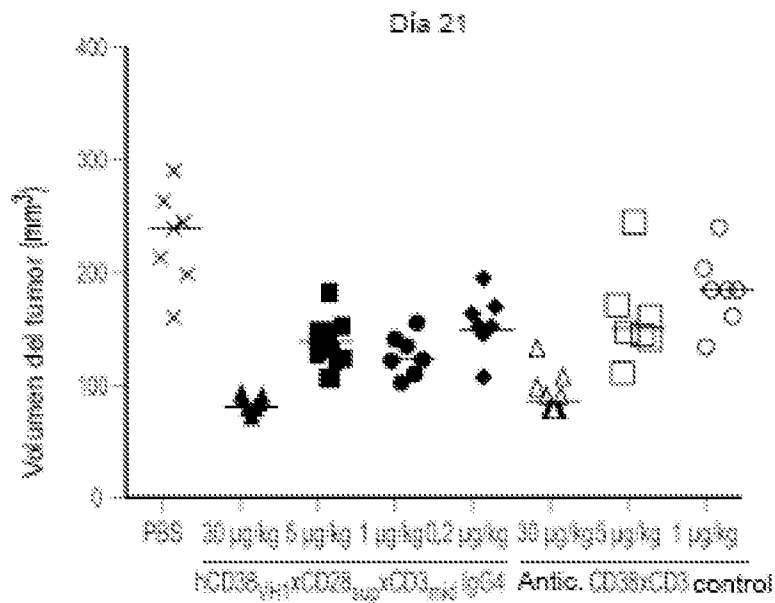
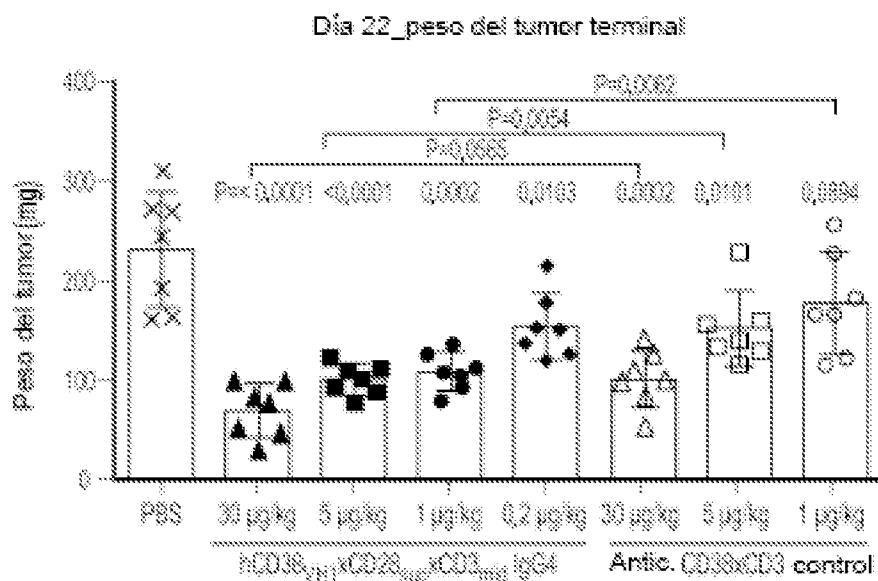
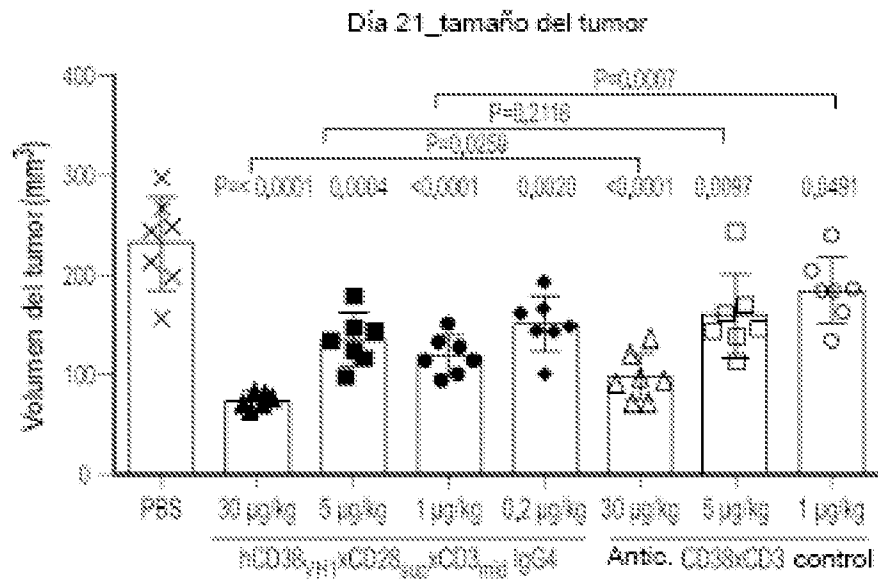


FIG. 13C



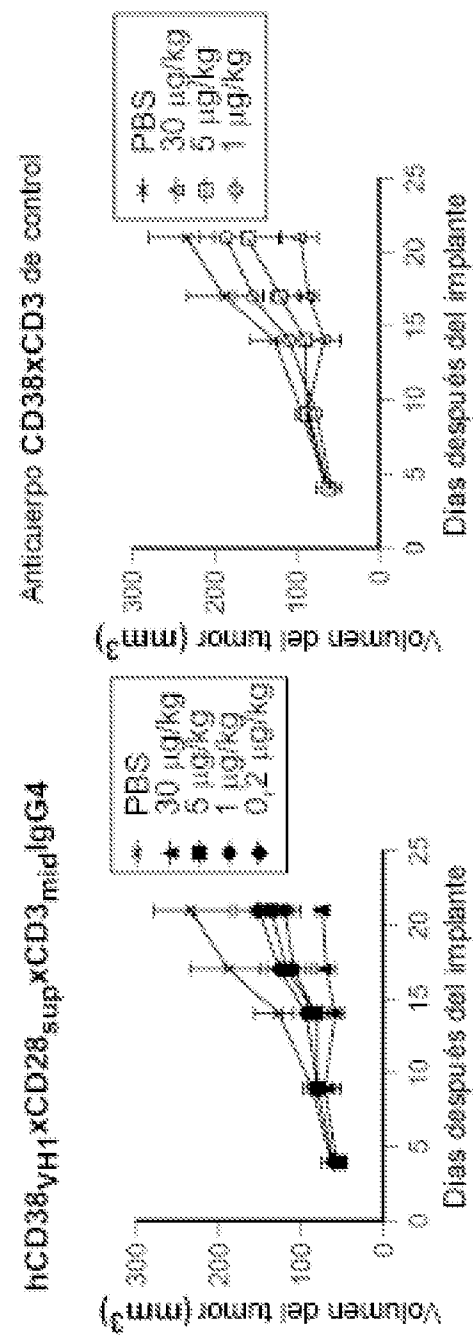
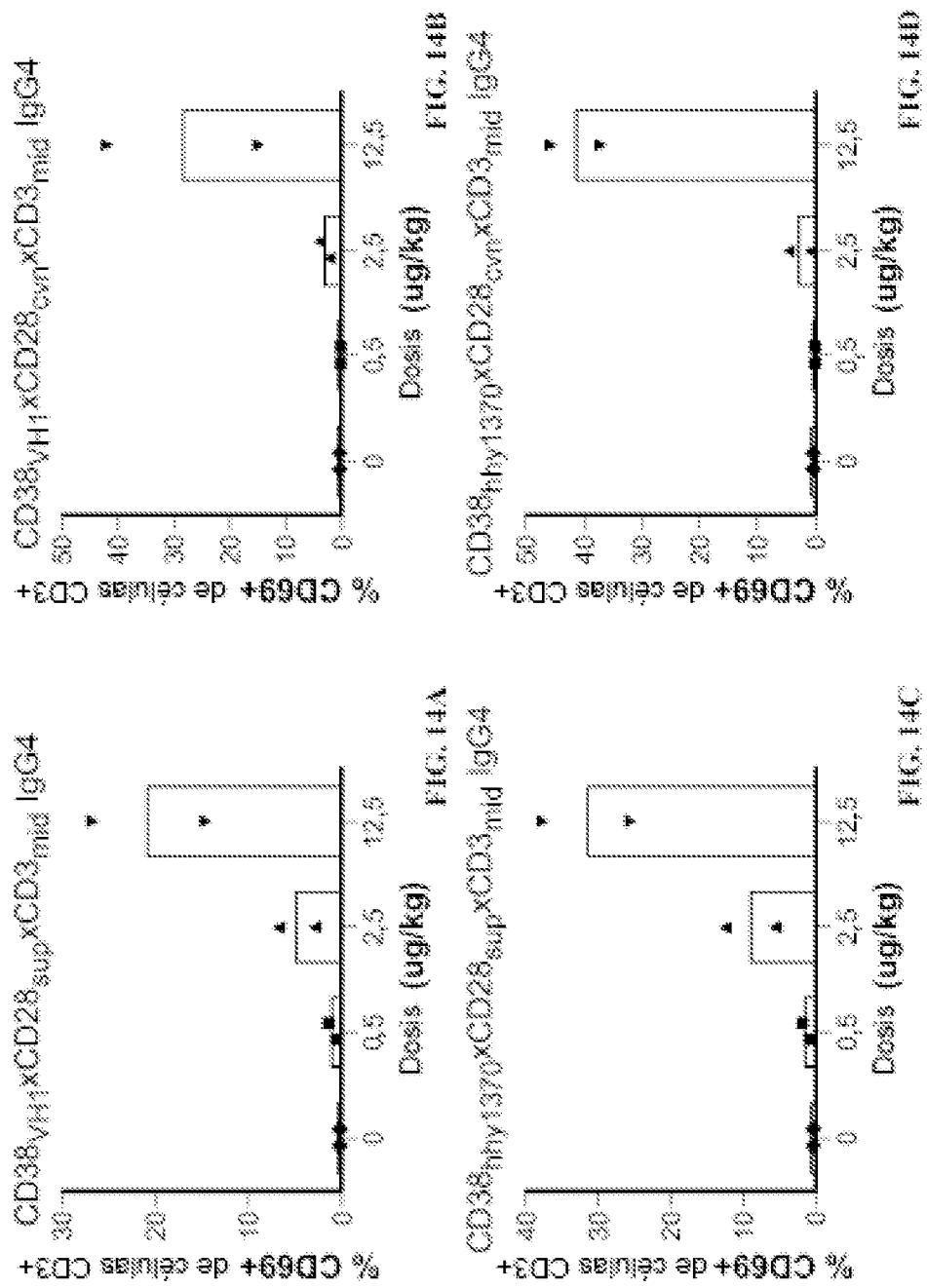
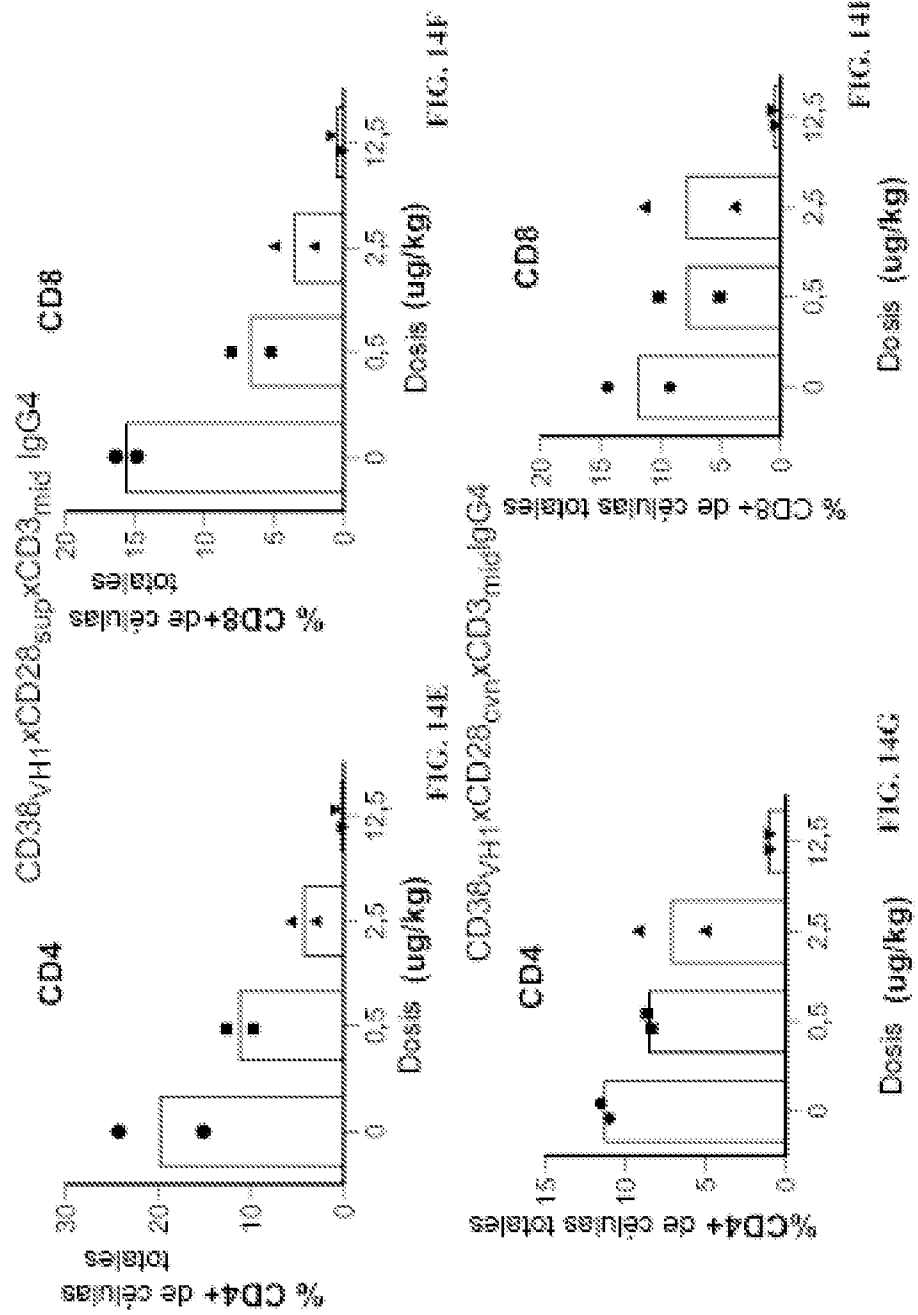


FIG. 13F





CD38_{hi}1370xCD28_{sup}xCD3_{mid}lgG4

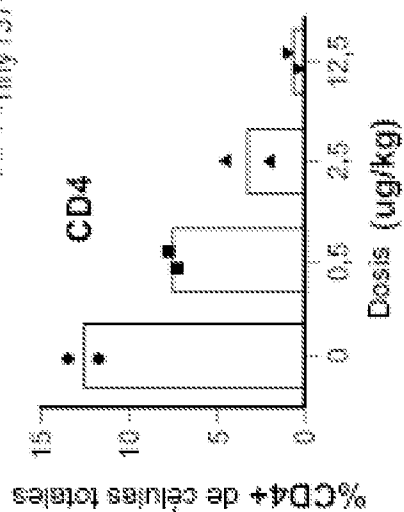


FIG. 14I

CD38_{hi}1370xCD28_{con}xCD3_{mid}lgG4

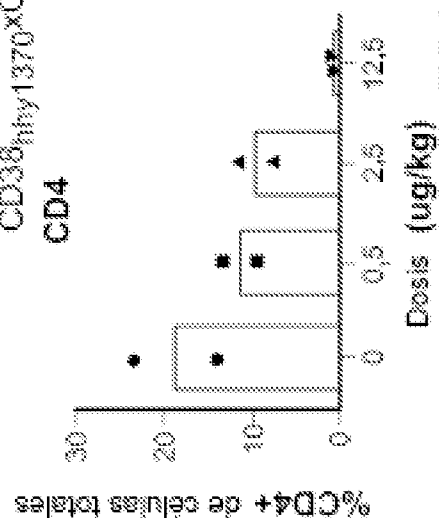


FIG. 14K

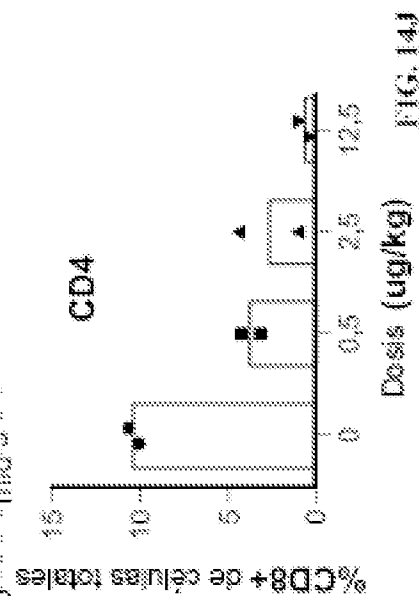


FIG. 14J

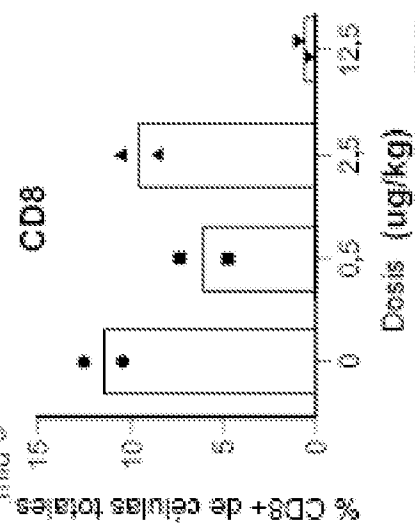
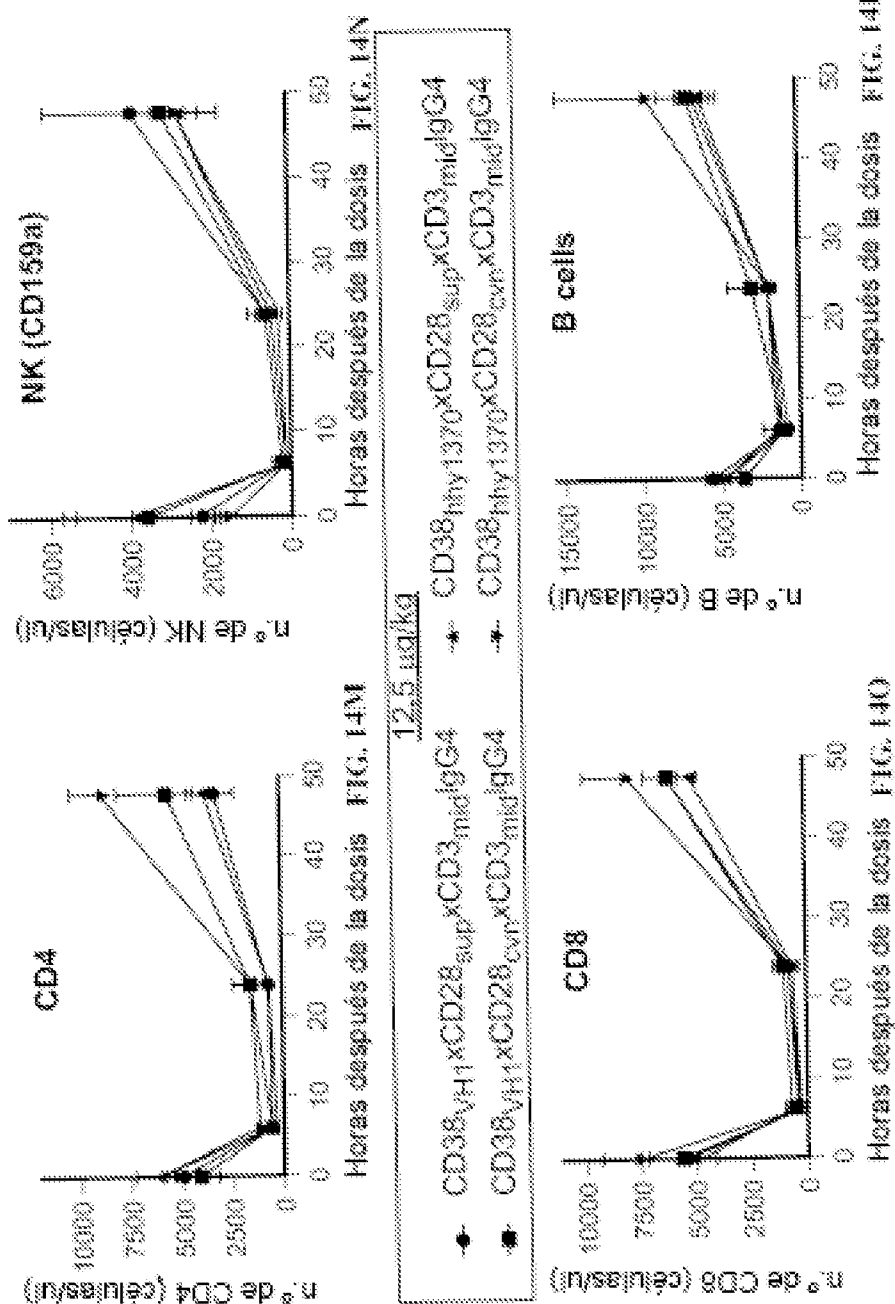


FIG. 14L



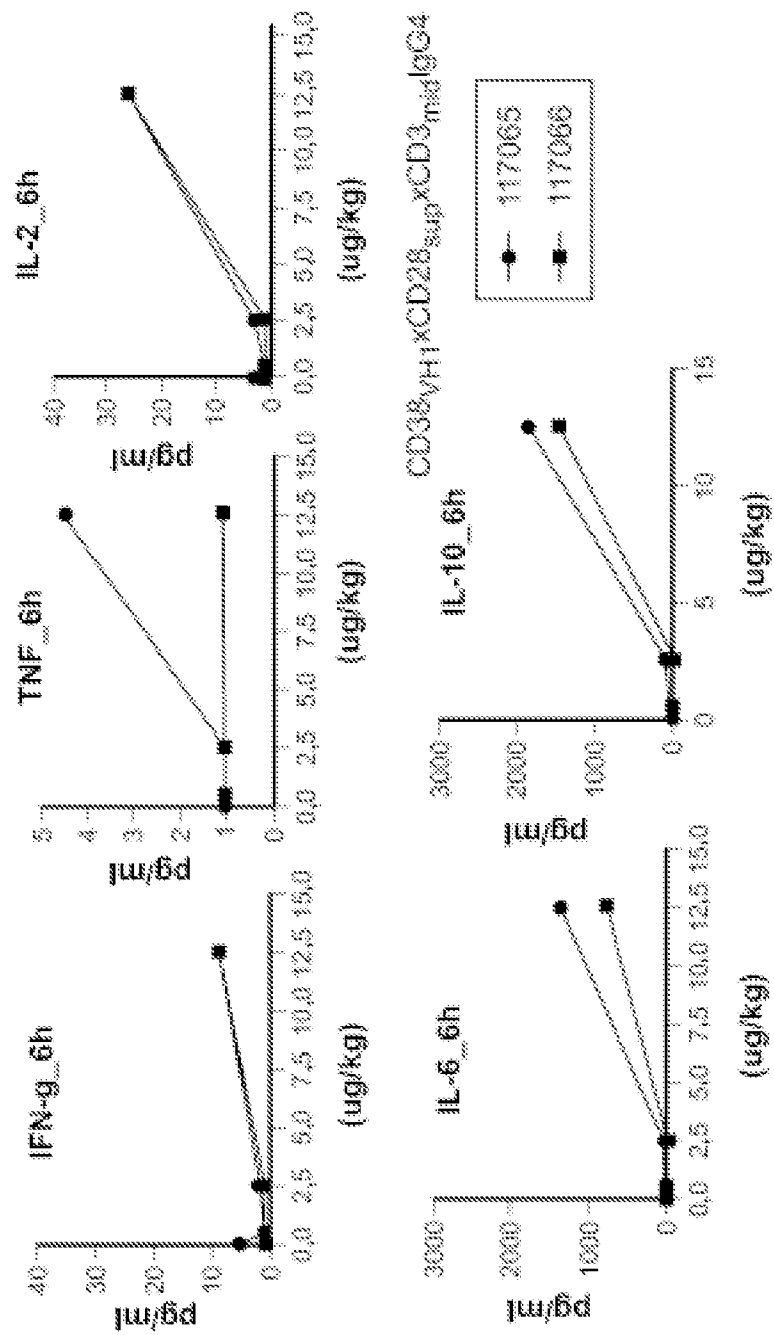


FIG. 14Q

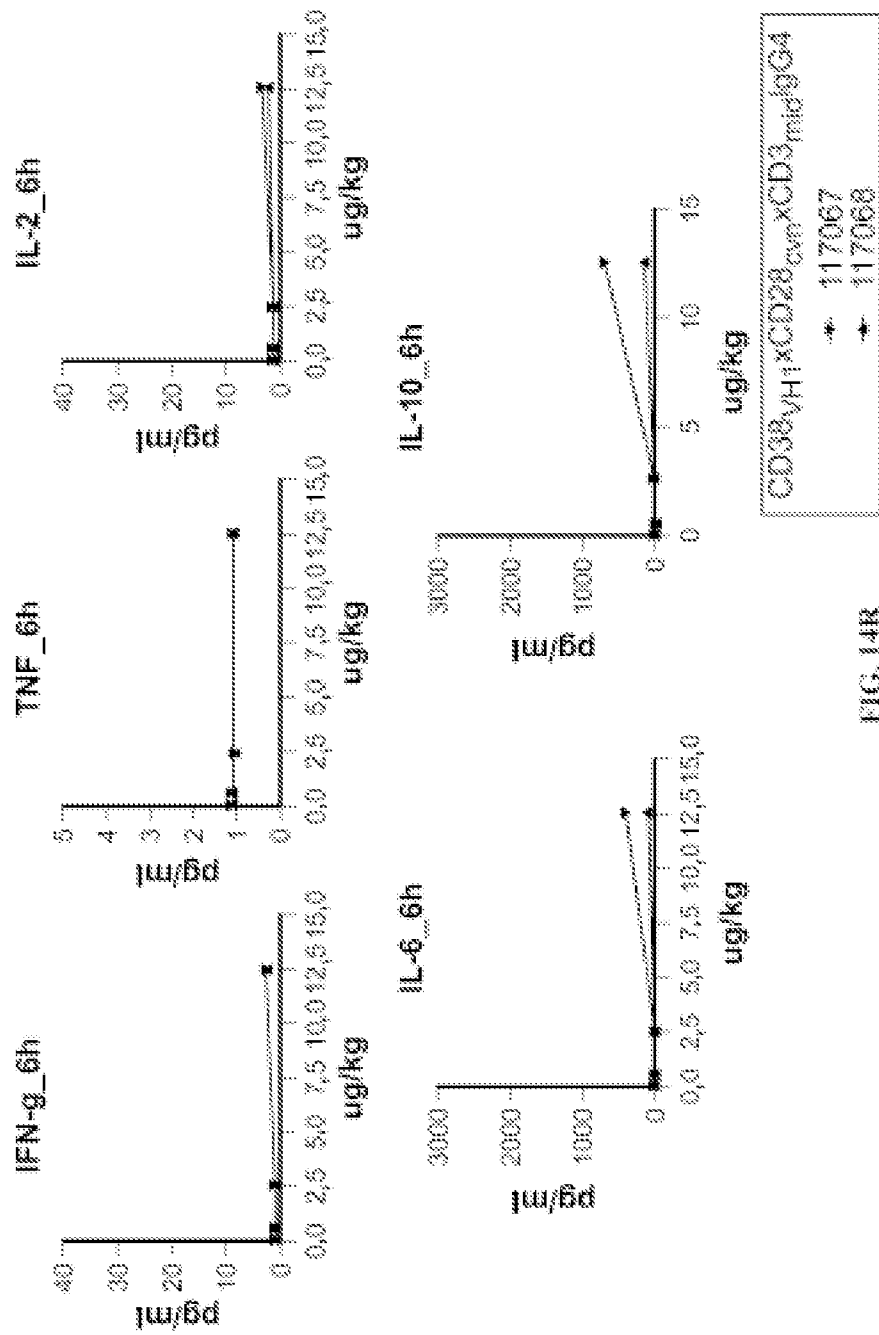


FIG. 14R

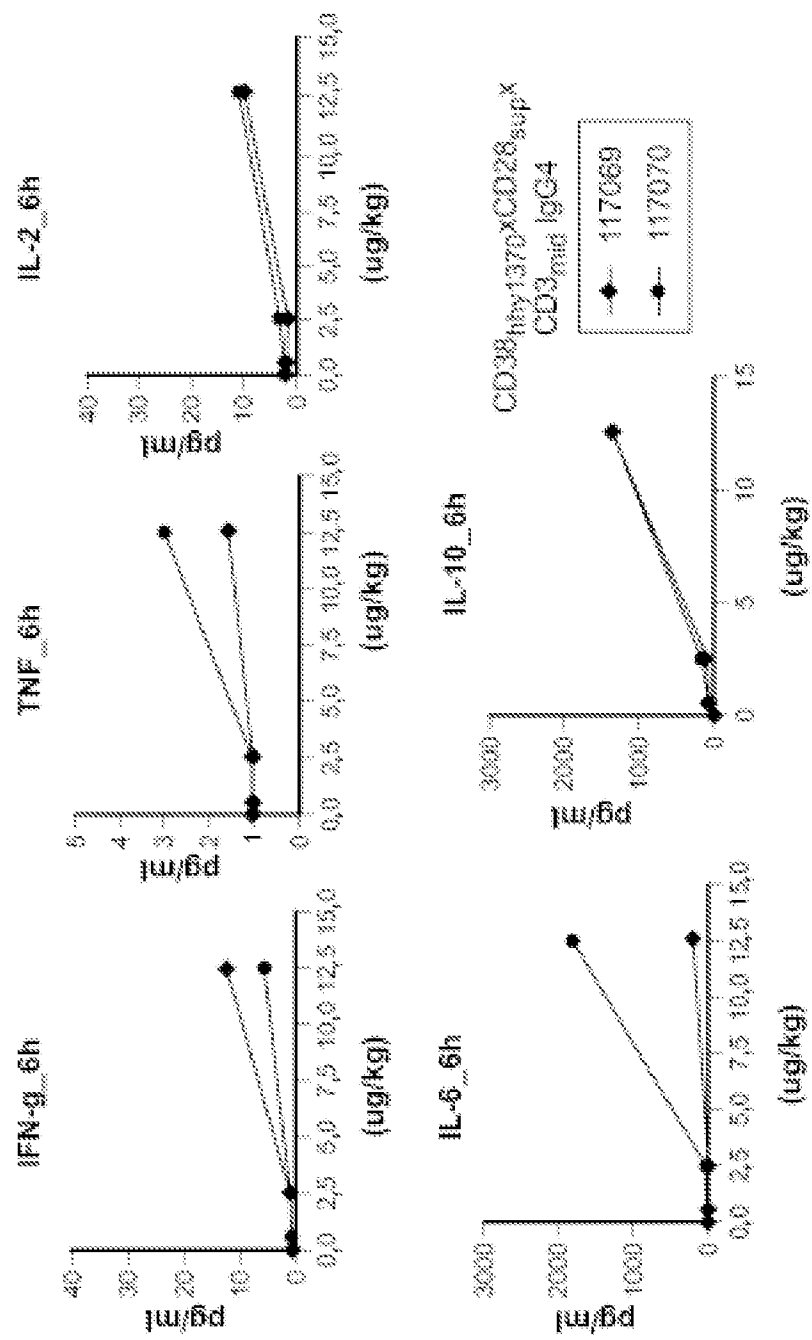


FIG. 148

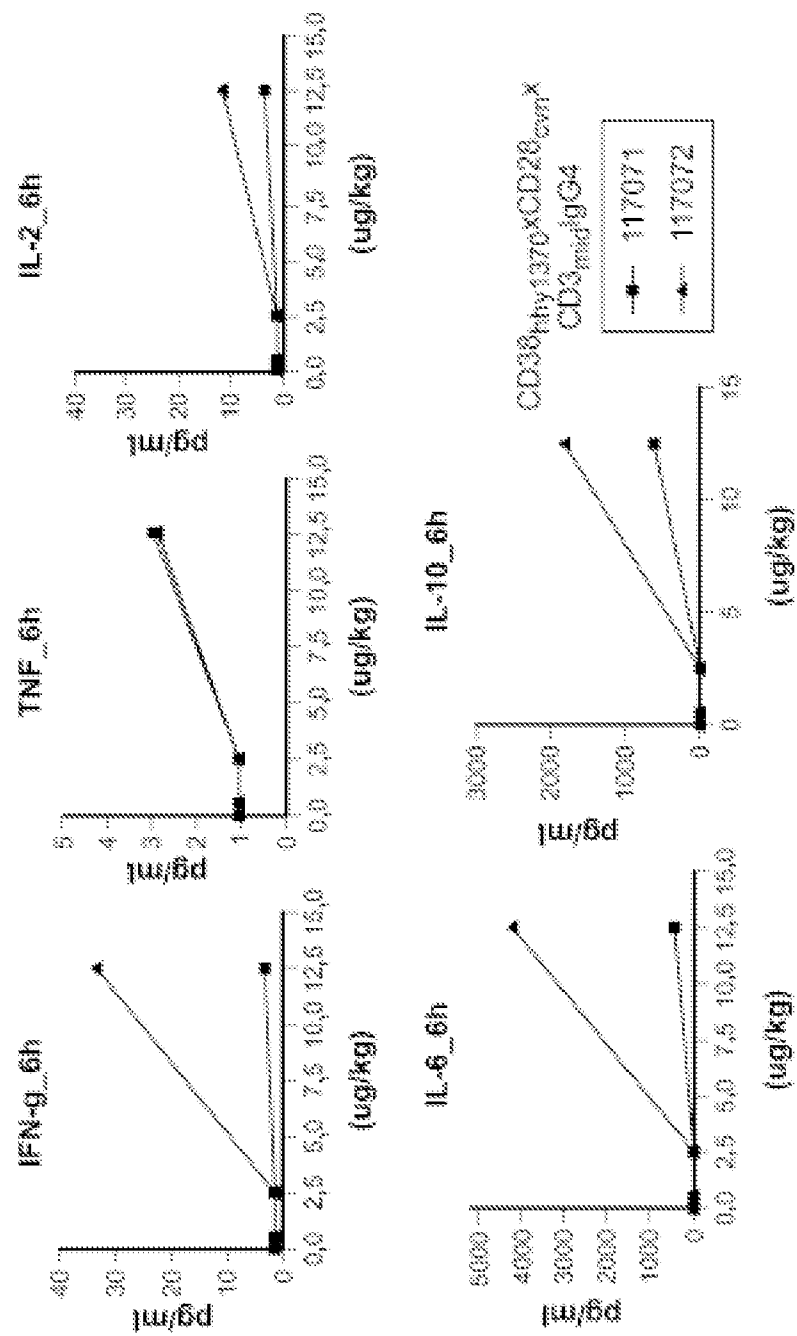


FIG. 14T

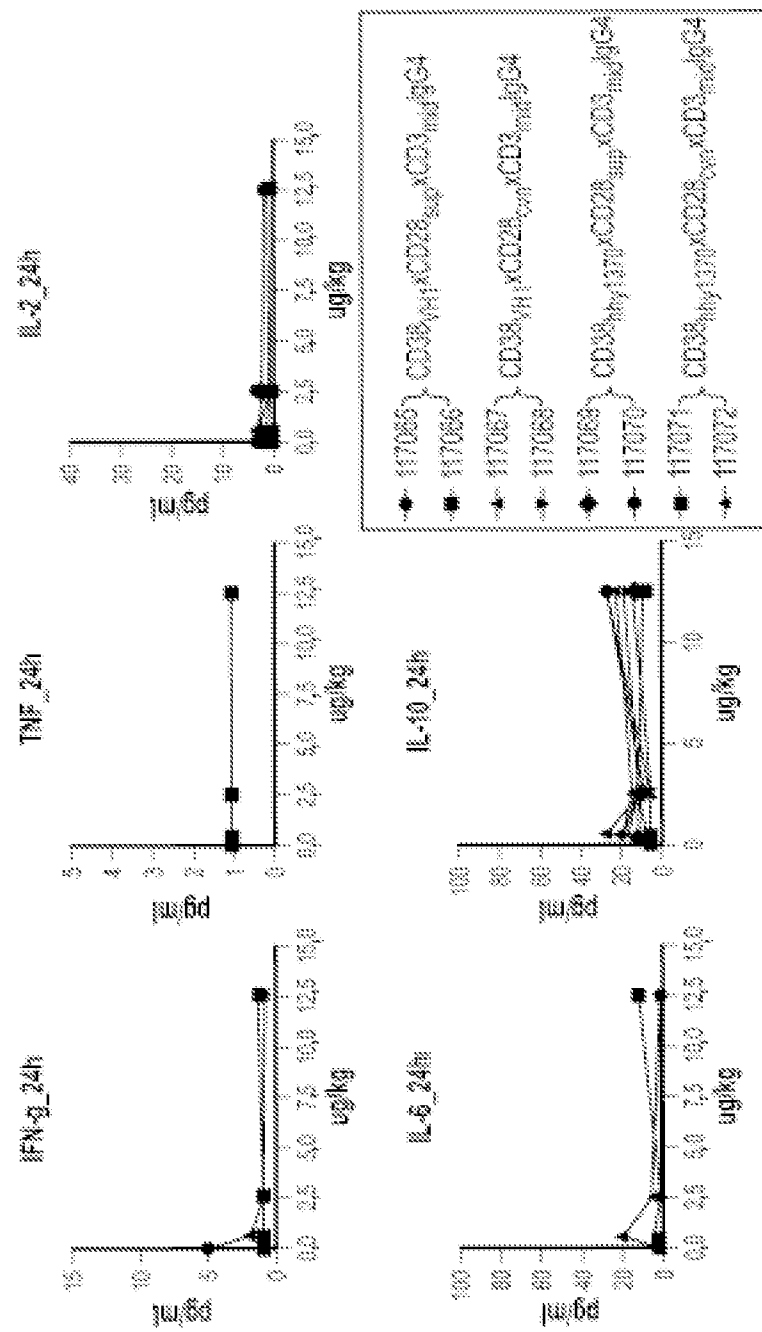


FIG. 14U

CD38_{VH1} / CD28_{cvn}xCD3_{mid} IgG4

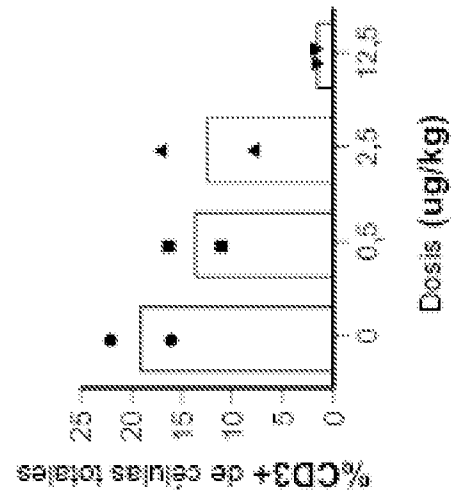


FIG. 14W

CD38_{VH1} / CD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4

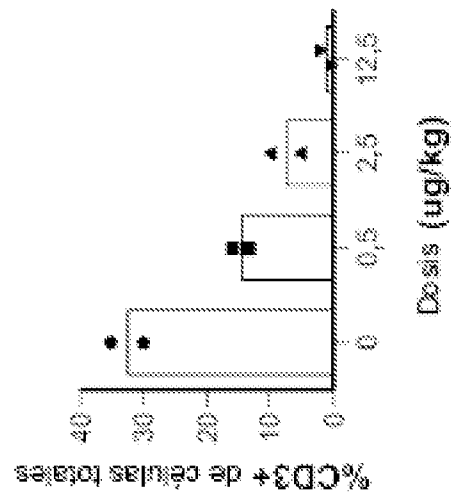


FIG. 14V

CD38_{hhy1370}/CD28_{sup}xCD3_{mid} IgG4

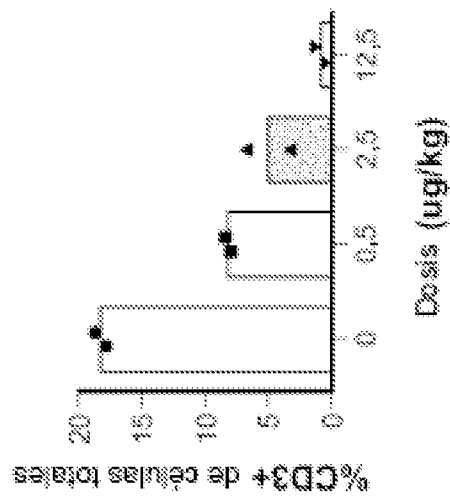


FIG. 14X

CD38_{hhy1370}/CD28_{con}xCD3_{mid} IgG4

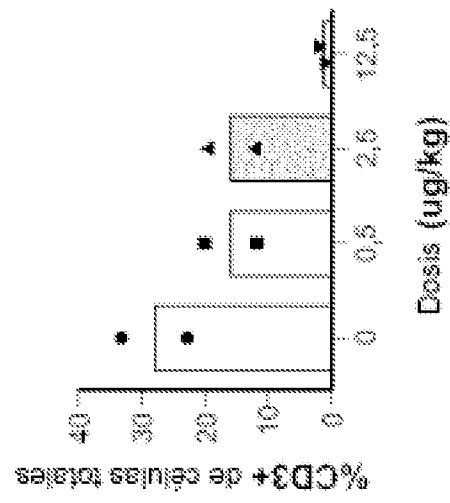


FIG. 14Y

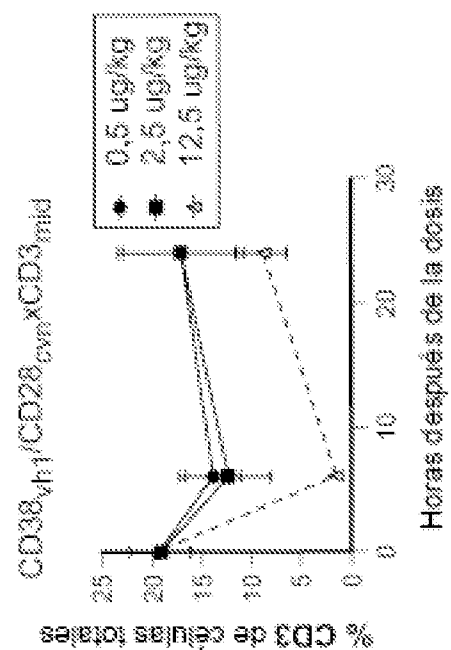


FIG. 14A

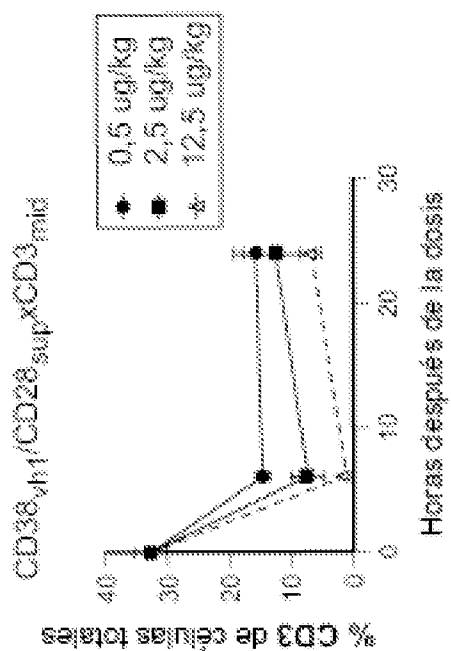


FIG. 14Z

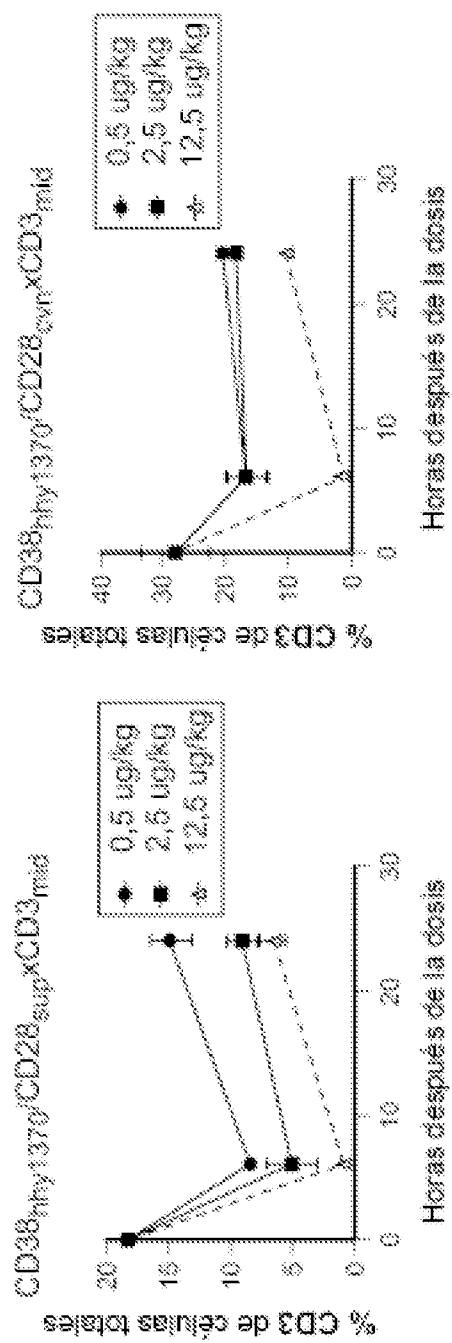


FIG. 14AC

FIG. 14AB

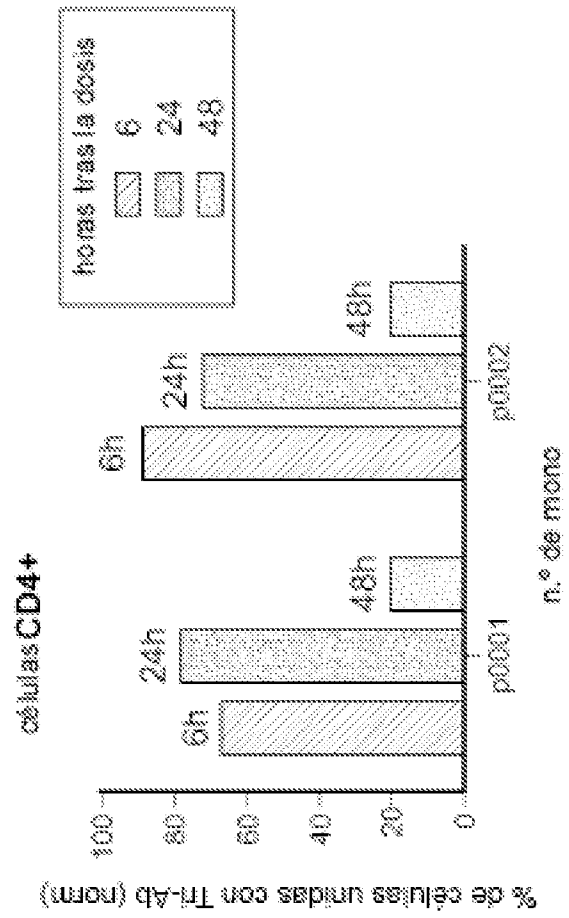


FIG. 14AD

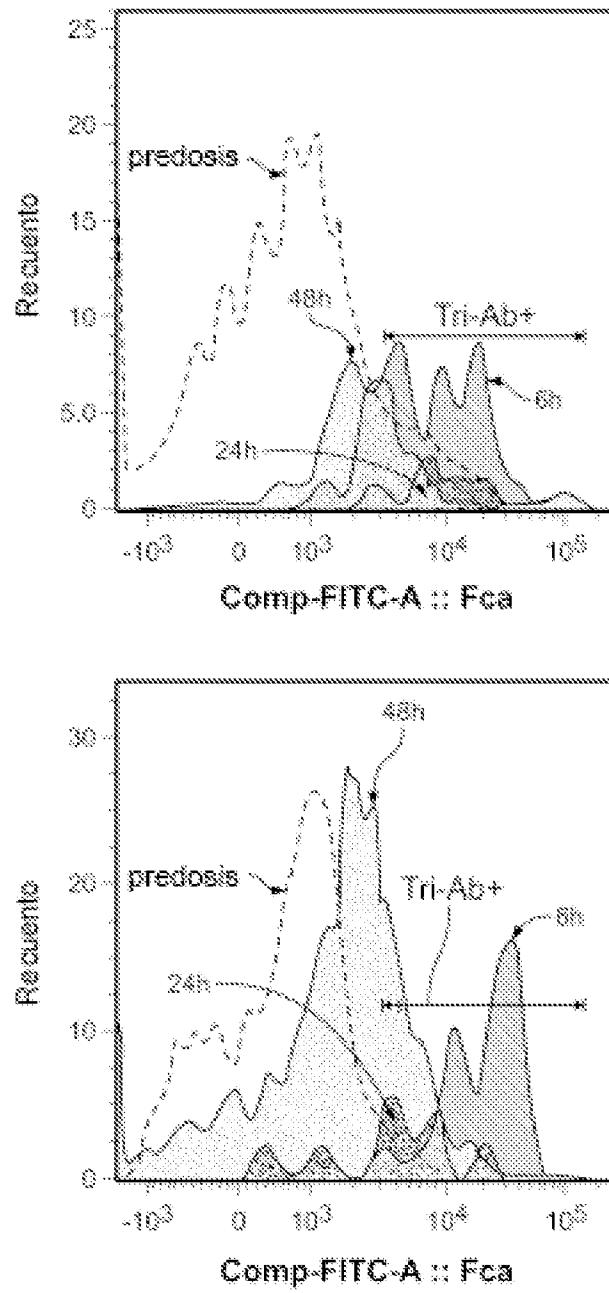


FIG. 14AE

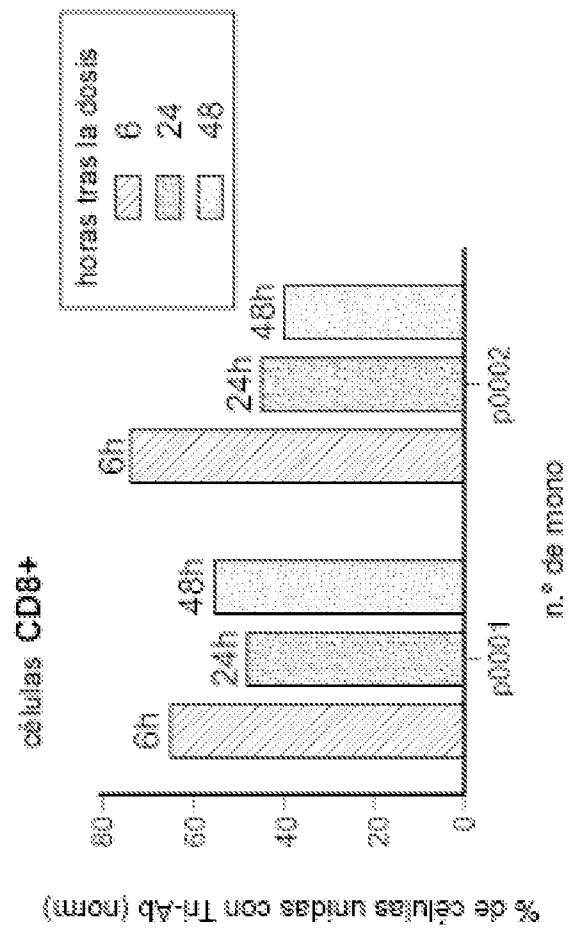


FIG. 14AF

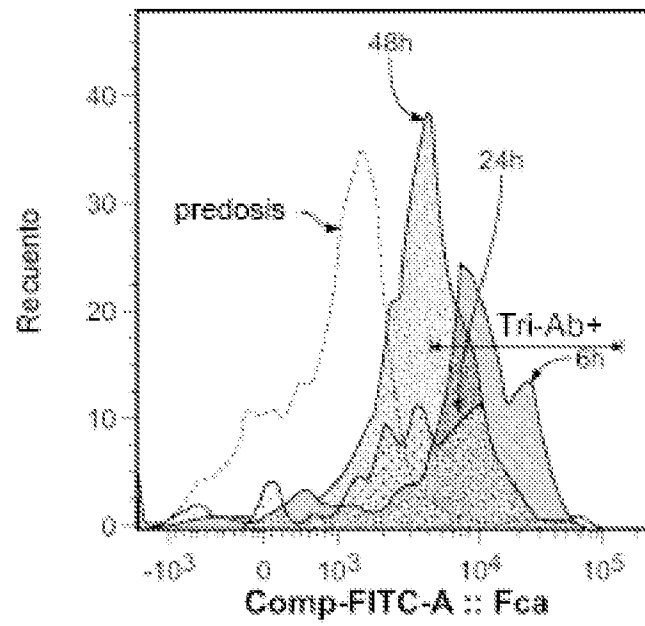
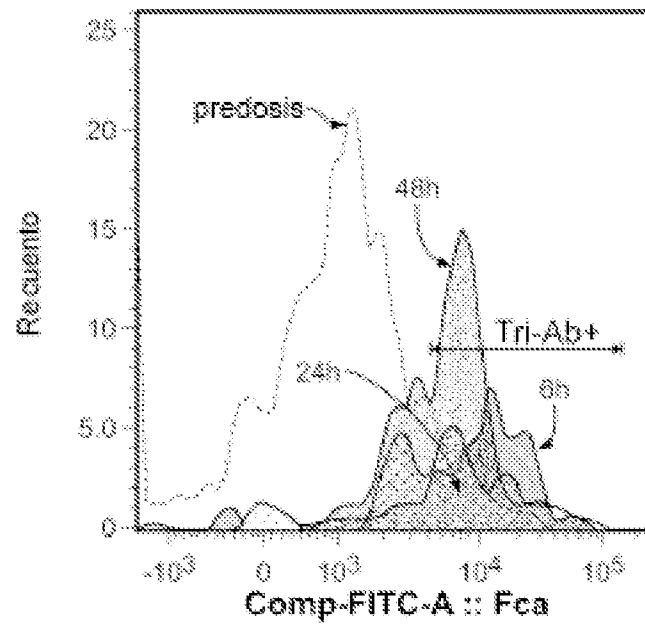


FIG. 14AG

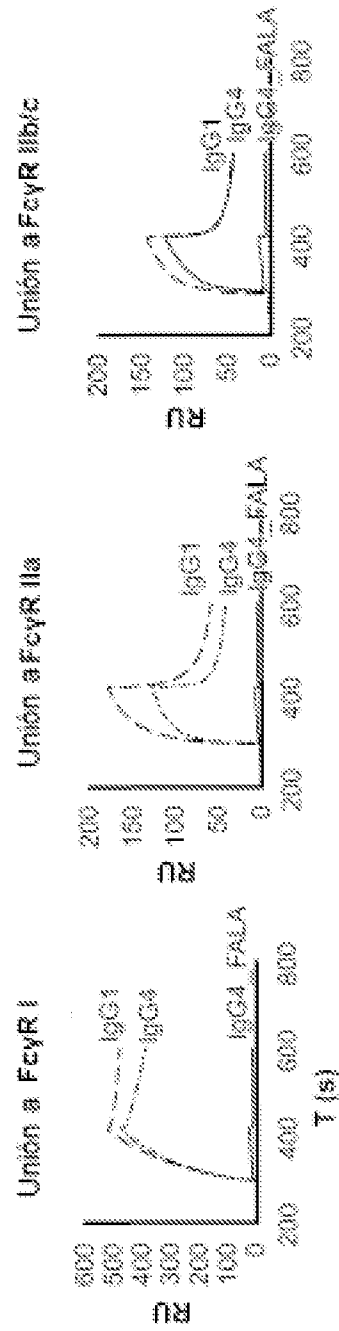


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C

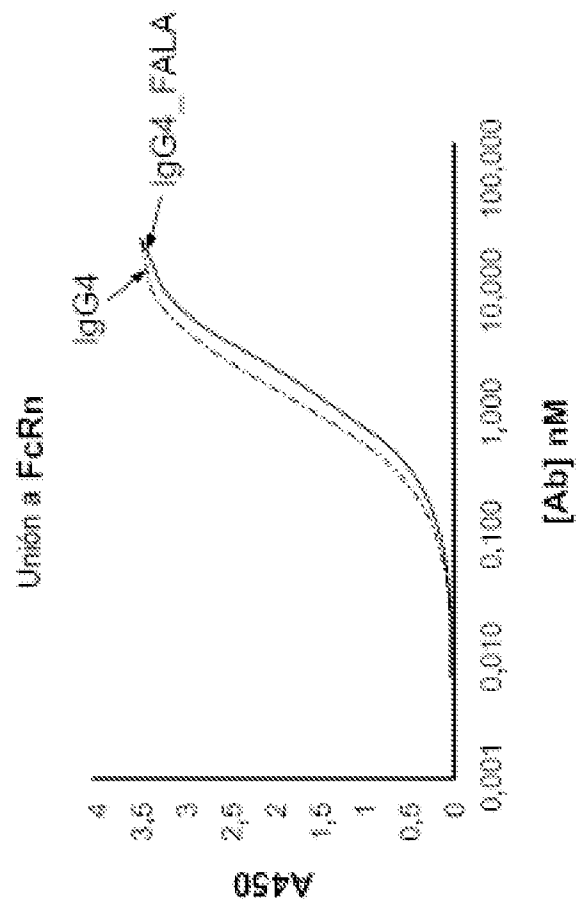


FIG. 16

Anticuerpo	T _{máx} (hr)	C _{máx} (ng/ml)	T _{ult} (hr)	C _{ult} (ng/ml)	T _{1/2} (hr)	ABClado (n° ng/ml)
anti- hCD38 _{int} /CD28 _{ext} CD3 _{int} IgG4	0,083	460	72	15,6	24	4850
anti- hCD38 _{int} /CD28 _{ext} CD3 _{int} IgG4 FALA	0,083	495	336	117,1	234	61203
anti- hCD38 _{int} /CD28 _{ext} CD3 _{int} IgG1 LALA P329A	0,083	621	336	93,2	277	49600
anti- hCD38 _{int} /CD28 _{ext} CD3 _{int} IgG4 FALA	0,083	645	336	112,9	255	64500

FIG. 17

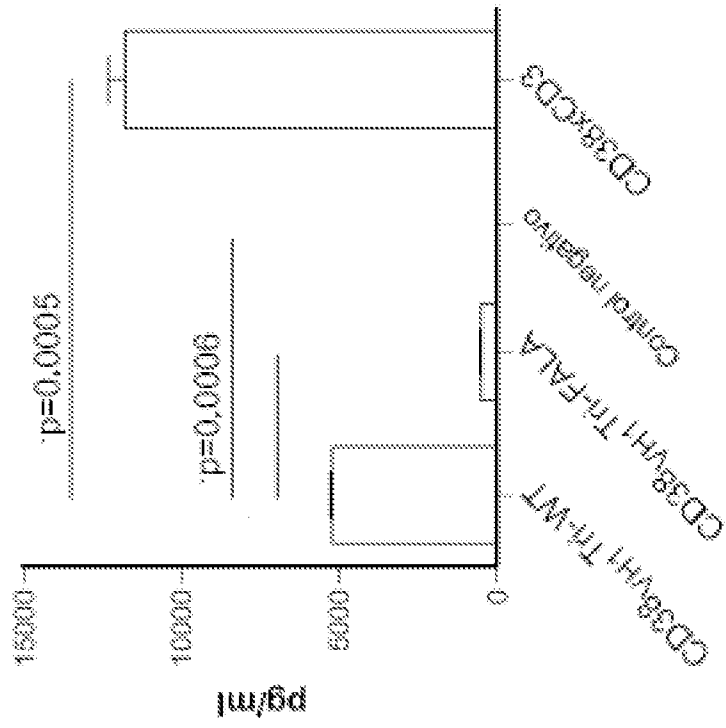


FIG. 18A

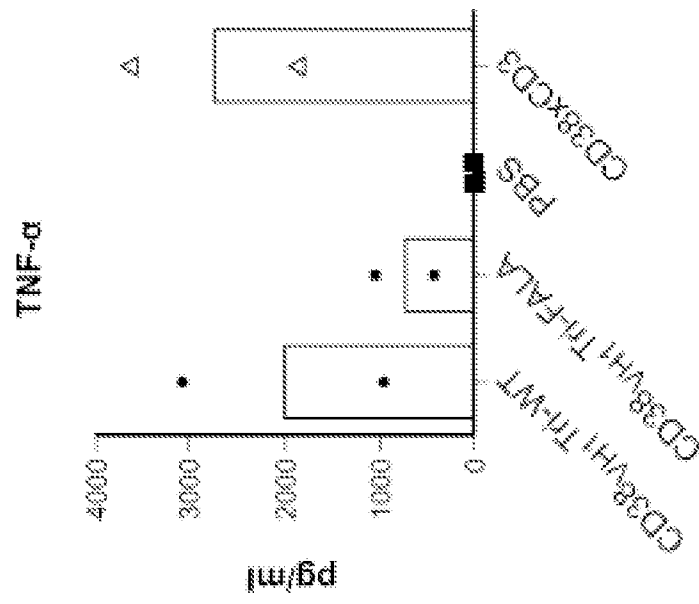


FIG. 18C

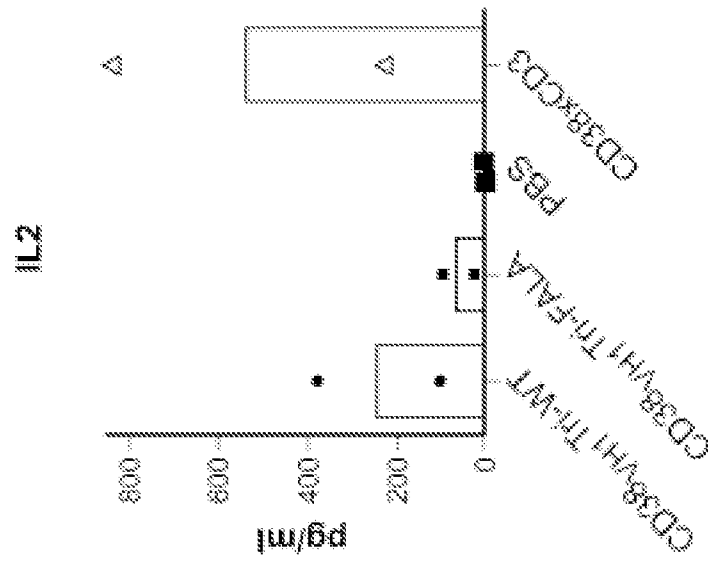


FIG. 18B

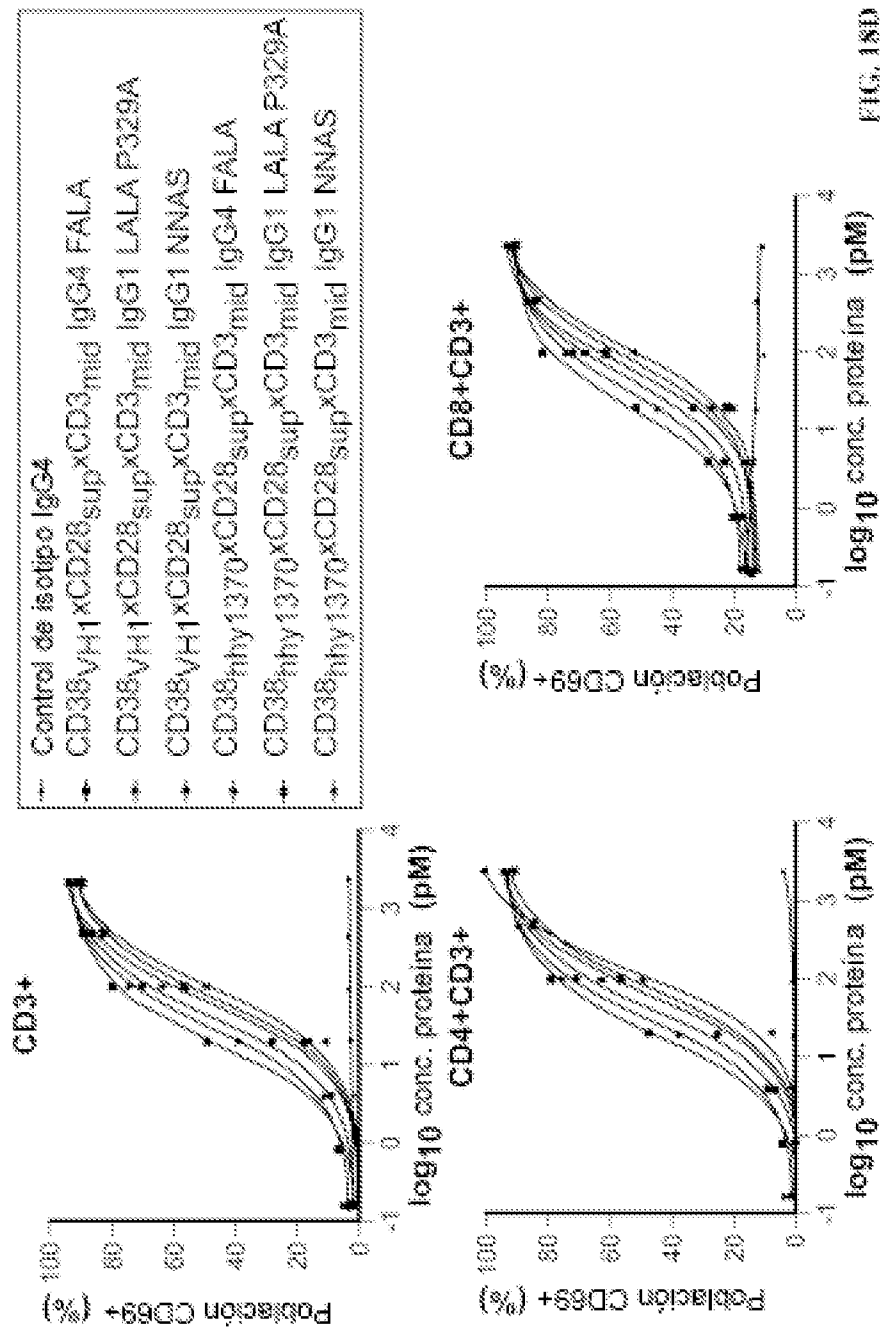


FIG. 18D

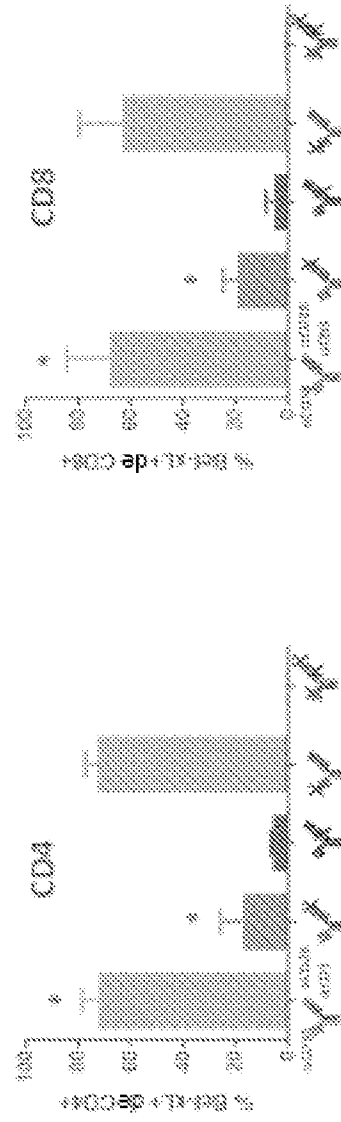
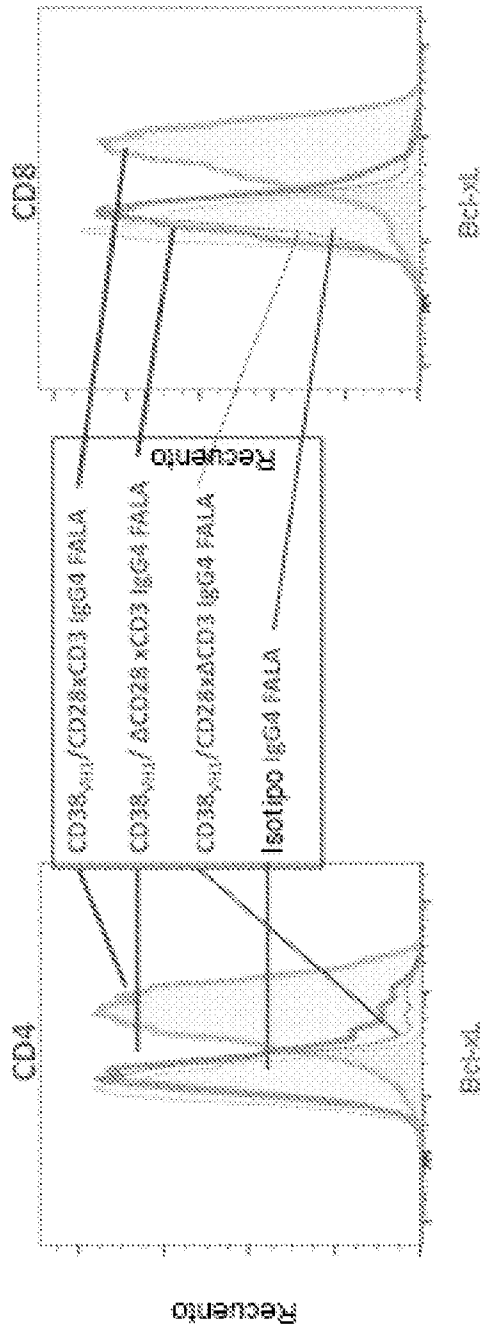


FIG. 19A

FIG. 19B

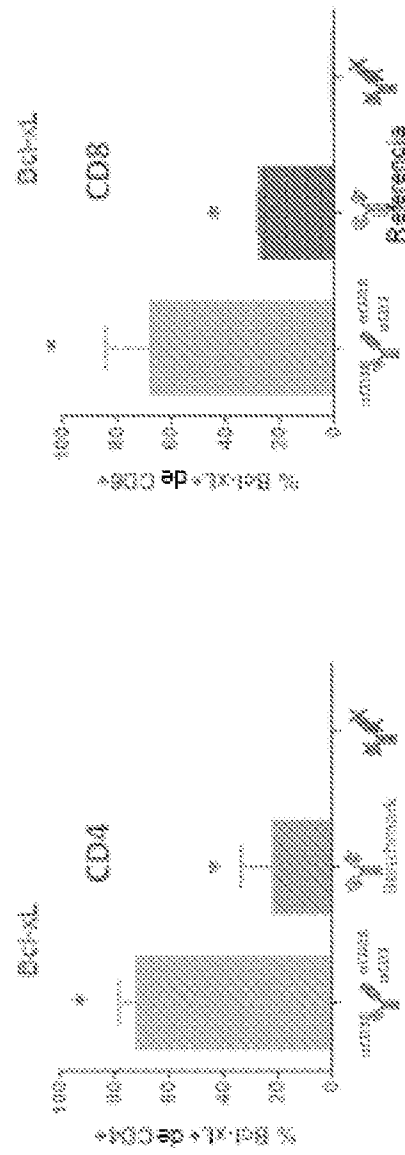
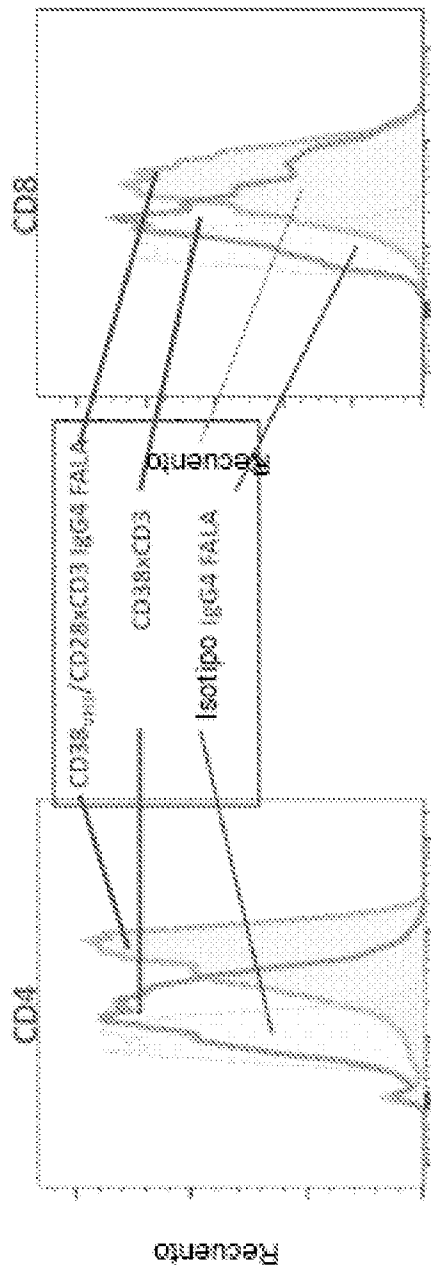


FIG. 19C

FIG. 19D

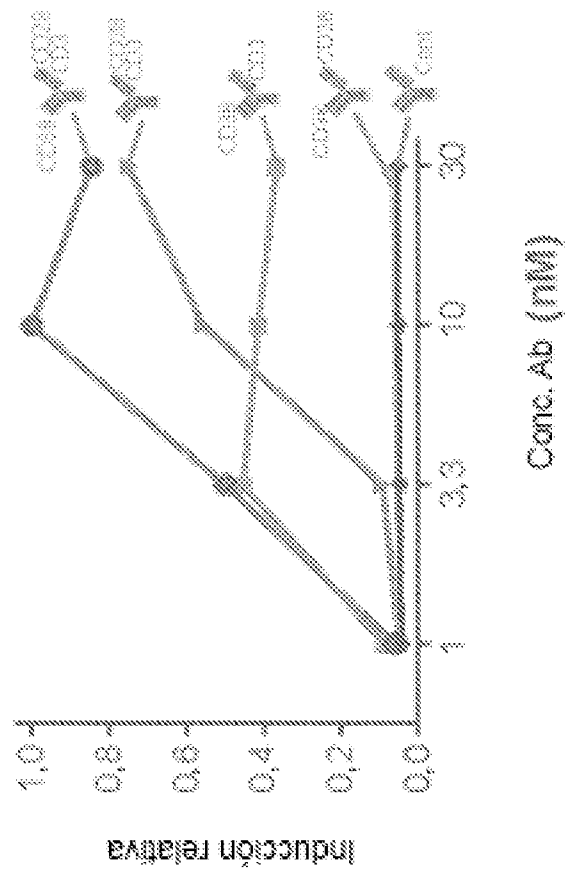


FIG. 19E

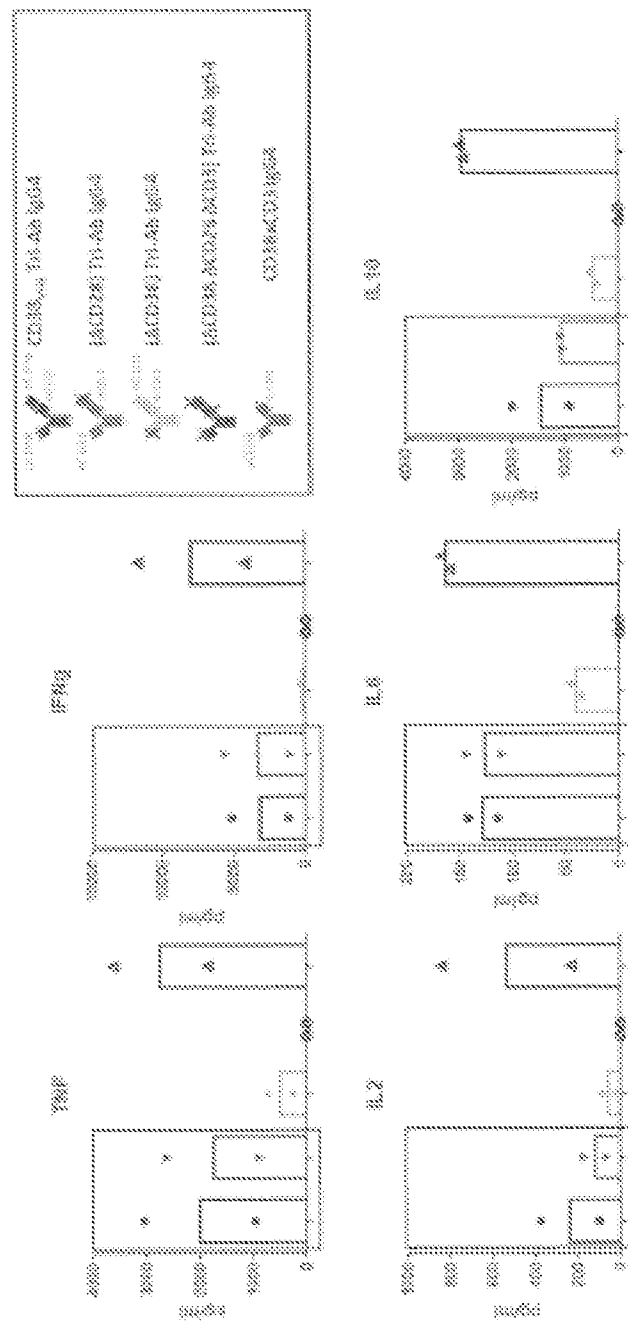


FIG. 19F

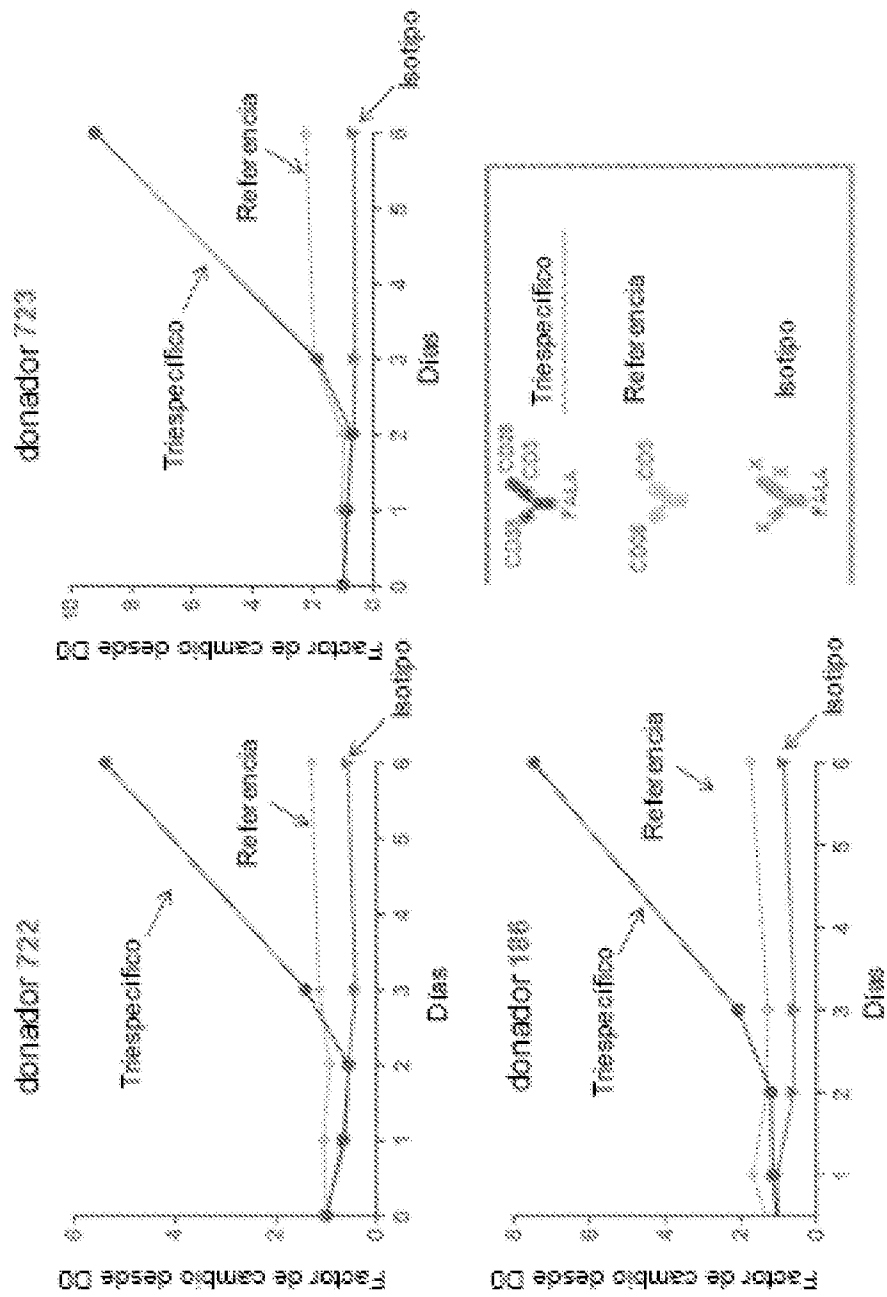


FIG. 19C

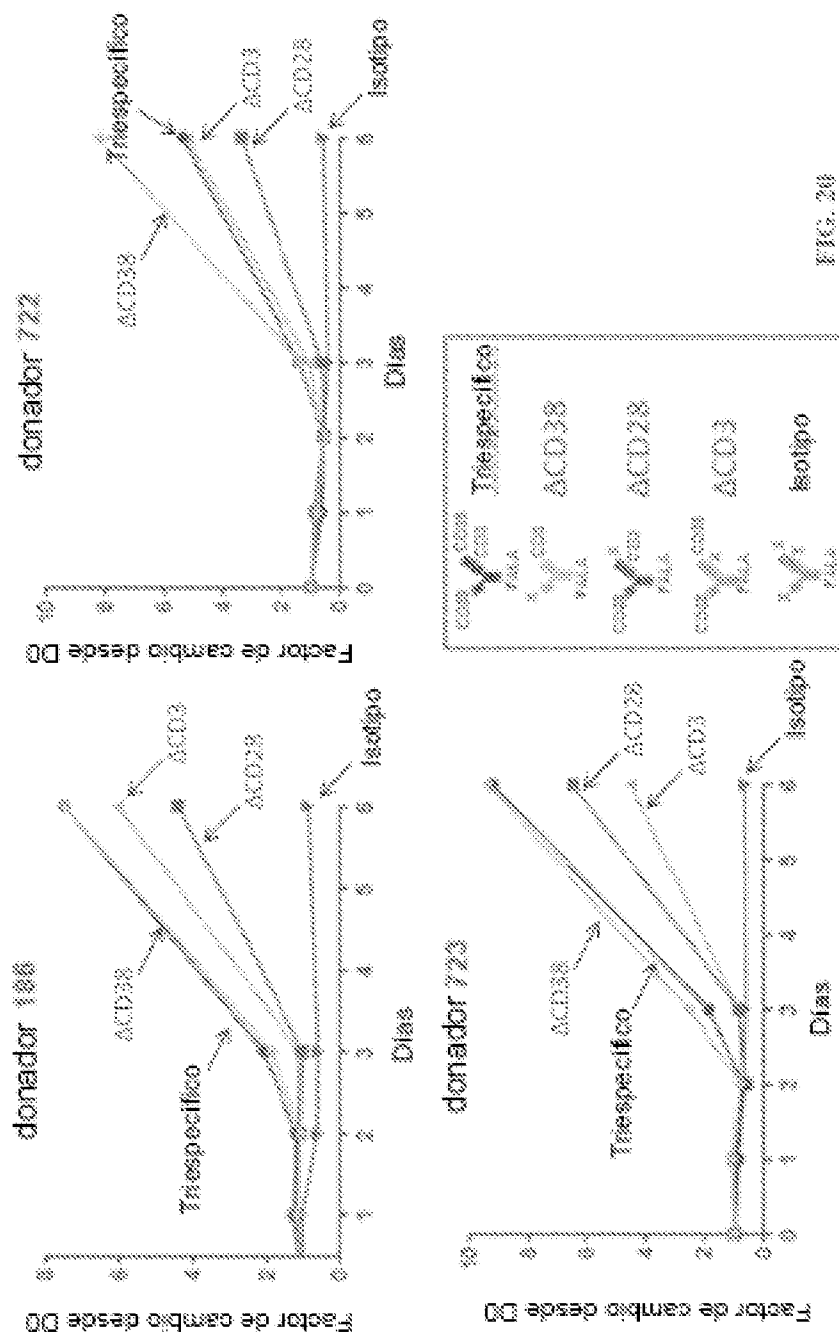
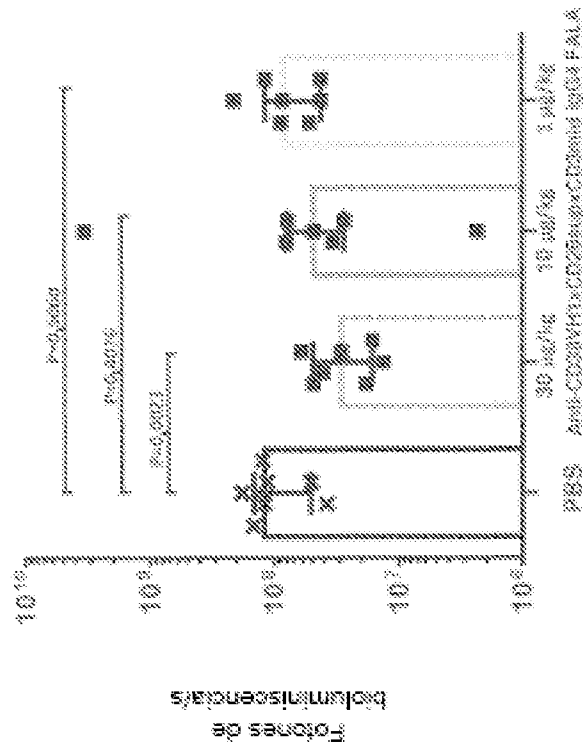
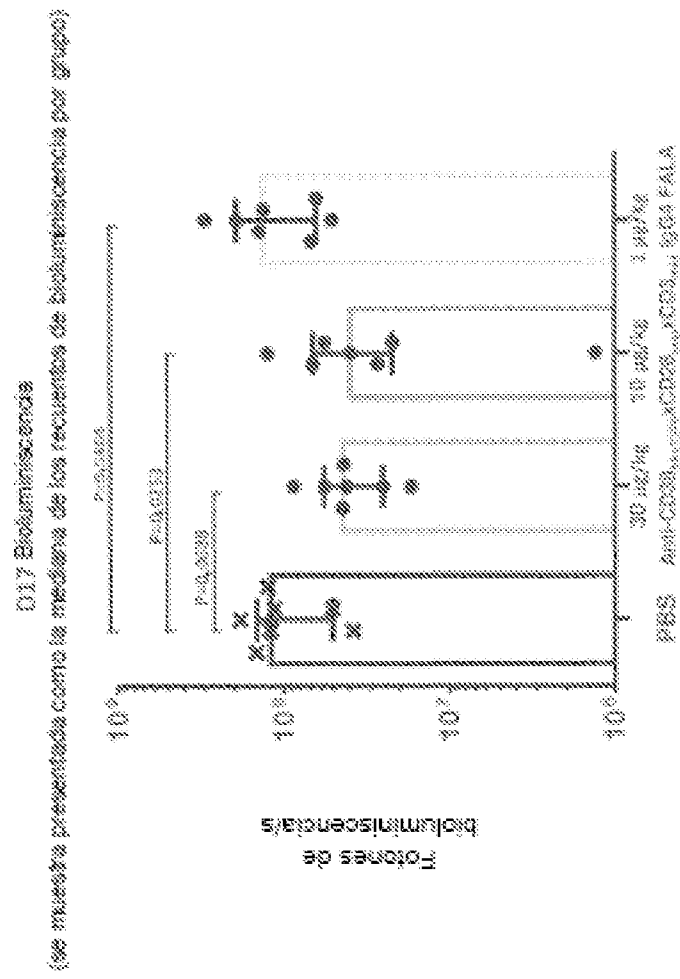


FIG. 20

© 1997 International Society for Technology in Education





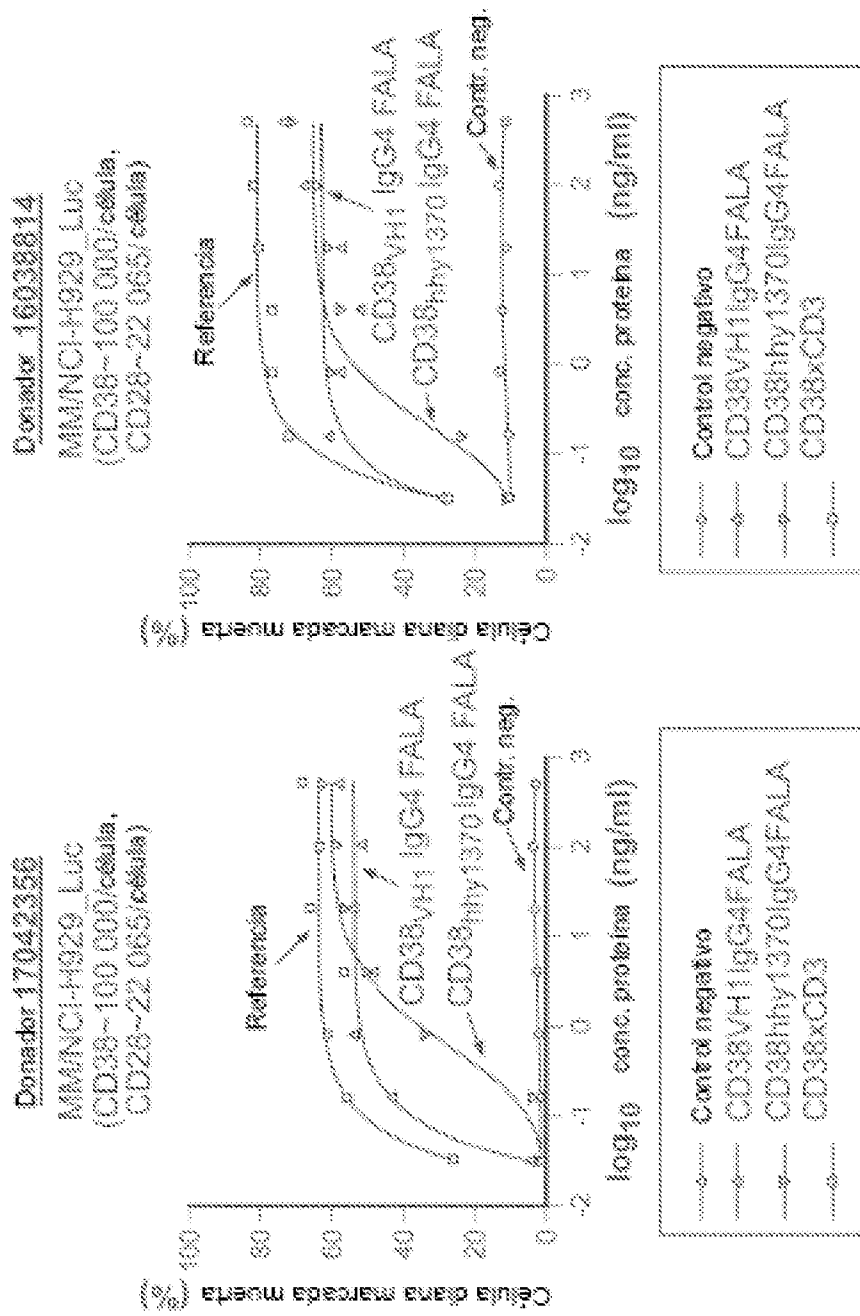


FIG. 23A

FIG. 23B

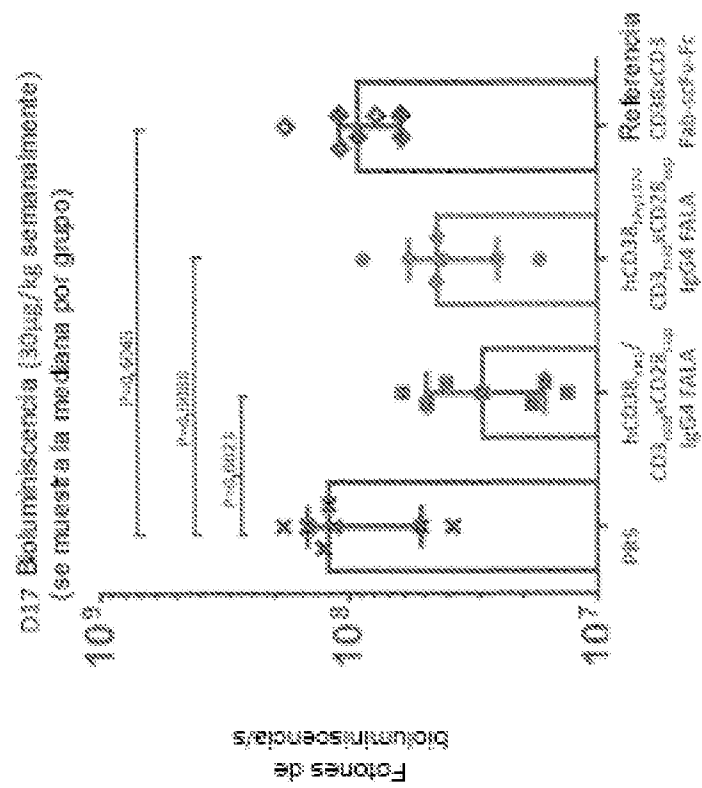


FIG. 23C

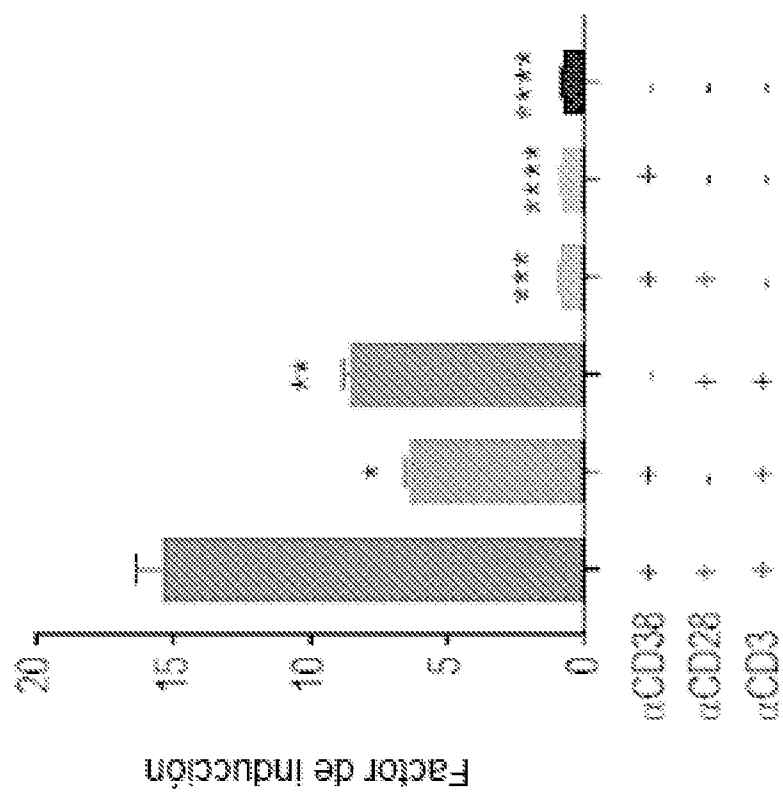


FIG. 24A

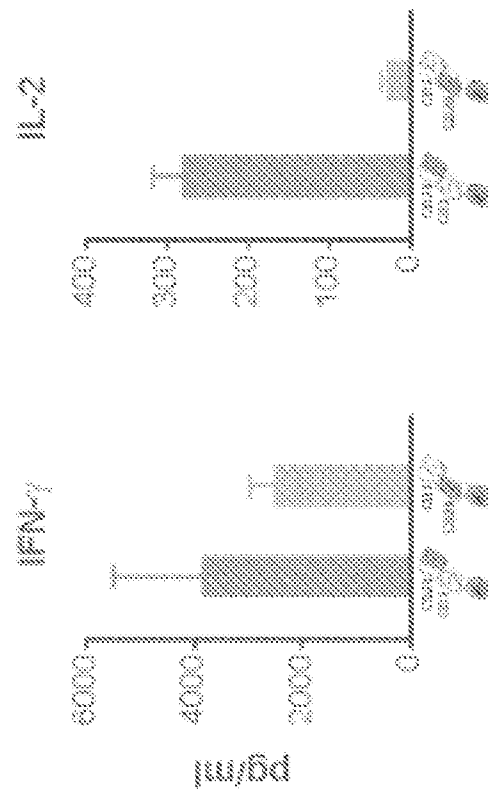


FIG. 24B

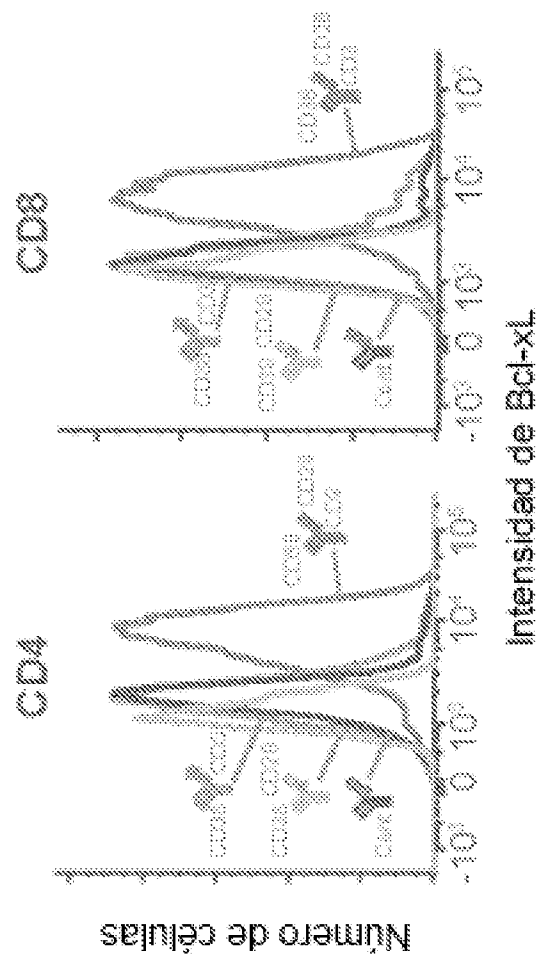


FIG. 25

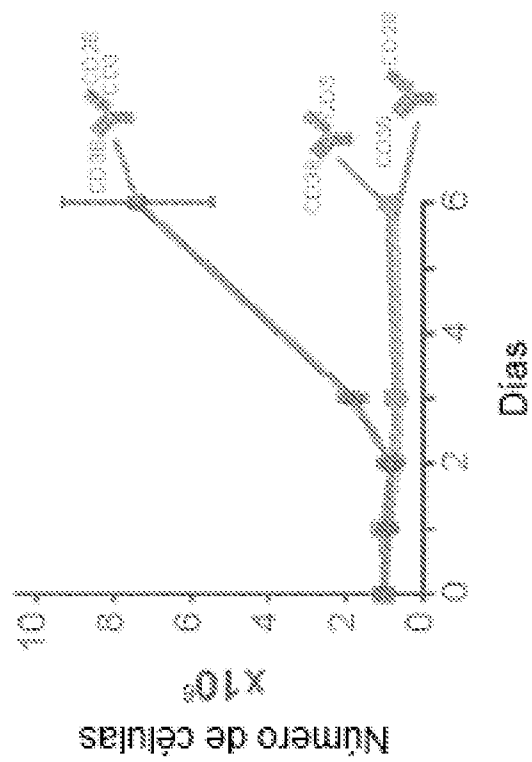


FIG. 26

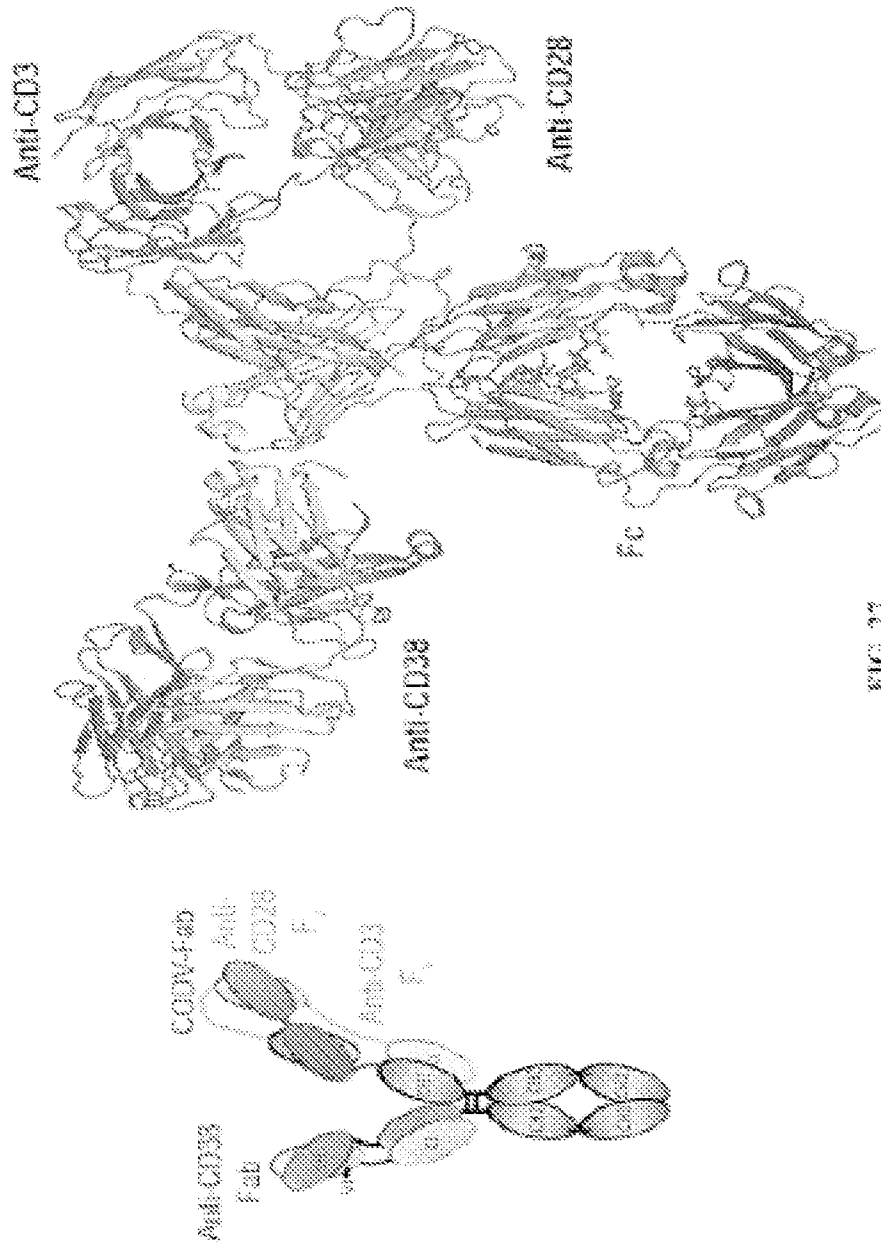
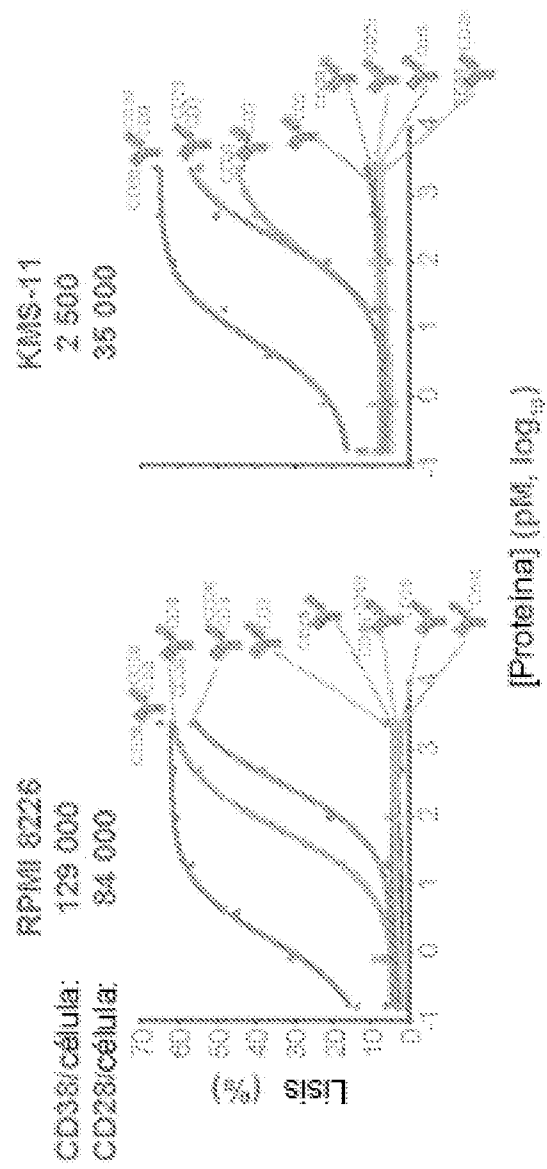


FIG. 27



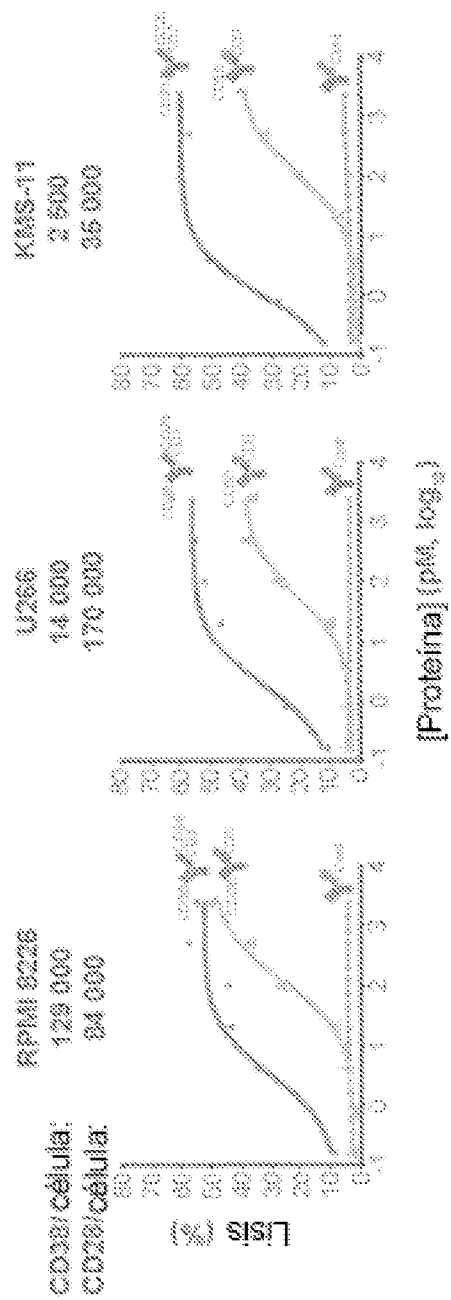


FIG. 29C

FIG. 29B

FIG. 29A

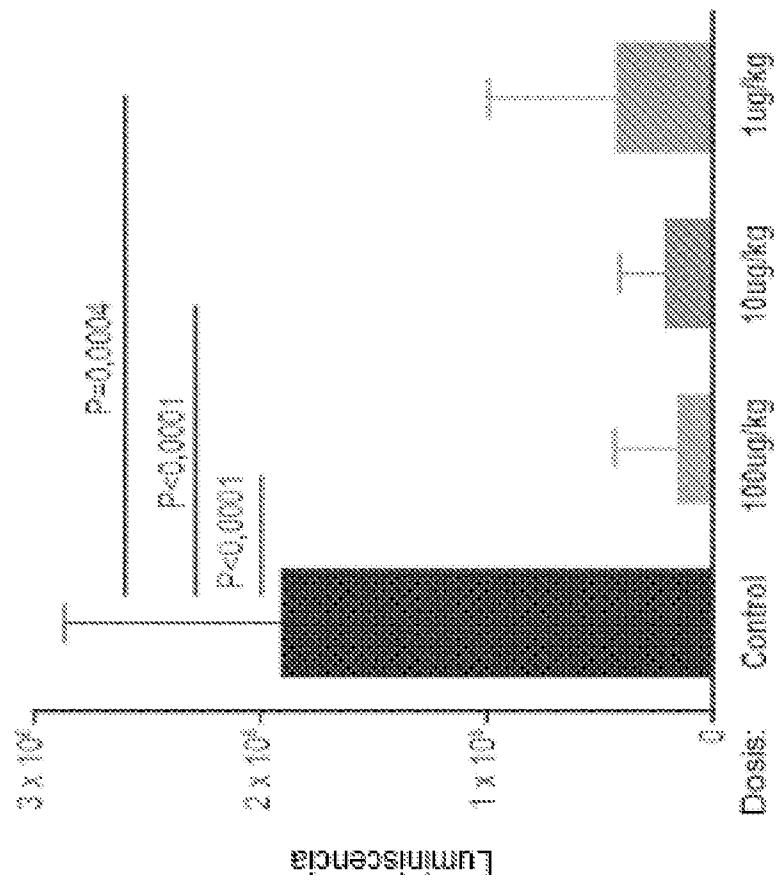


FIG. 30

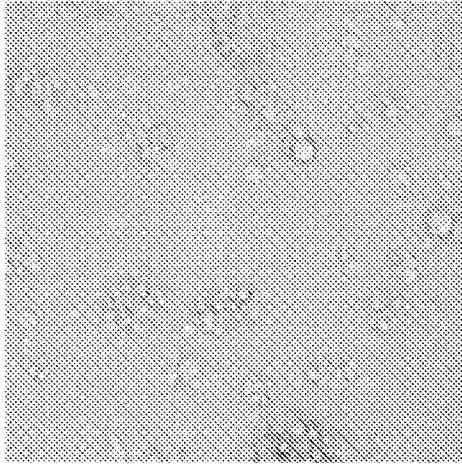


FIG. 3B

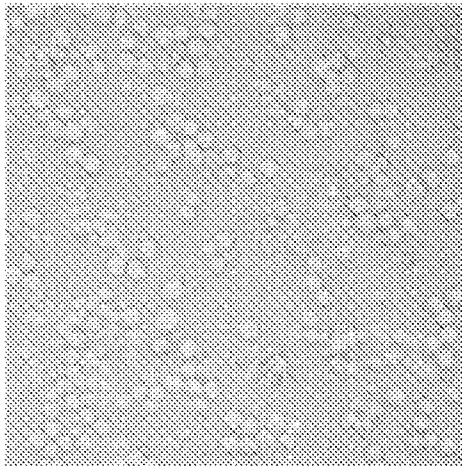


FIG. 3A

	Natural		Mutante
IgG1	CPPCPAPELGGPS	IgG1 LALA/P239A	CPPCPAPEAAGGPS
IgG2	CPPCPAPPVAG-PS	IgG1 PVA	CPPCPAPPVAG-PS
IgG4	CPPCPAPEFLGGPS	IgG4 FALA	CPPCPAPEAAGGPS

FIG. 32

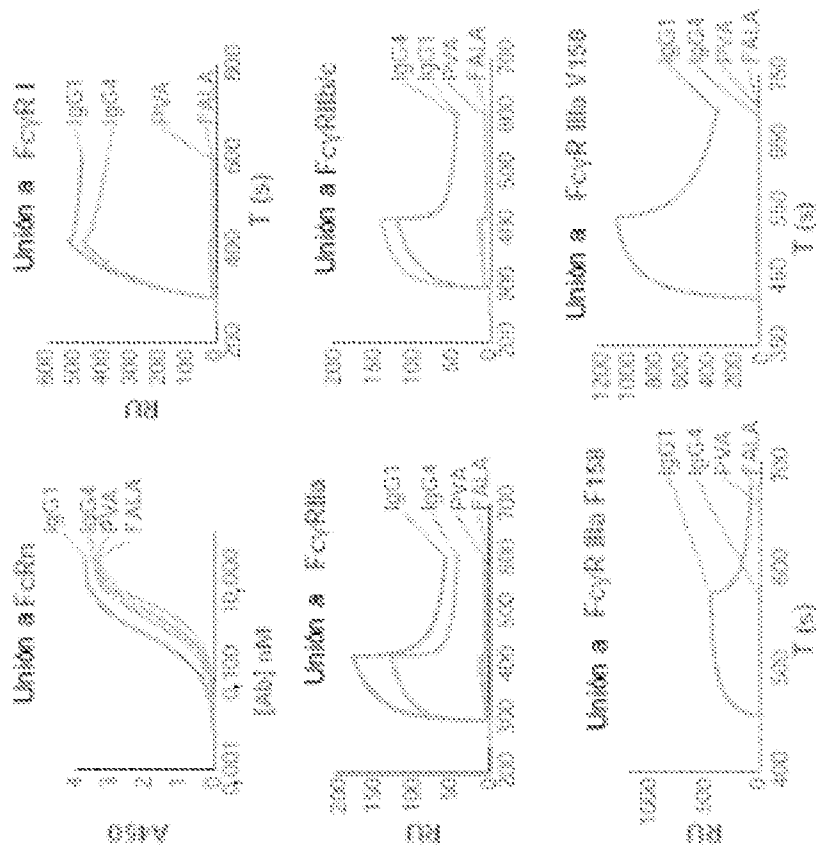


FIG. 33

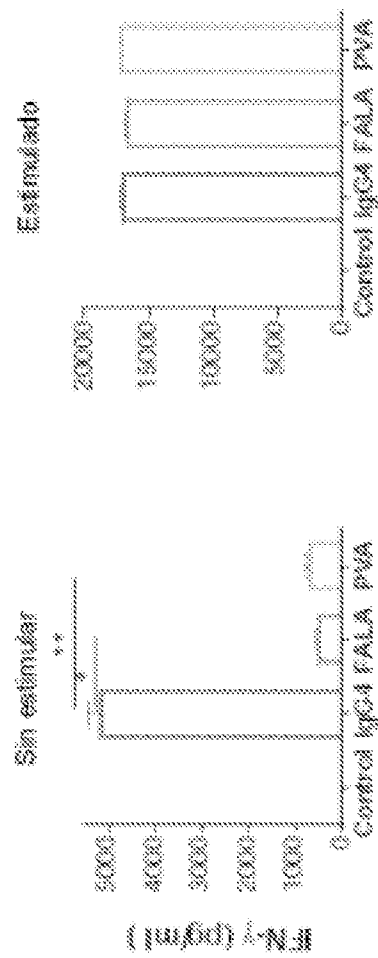


FIG. 34

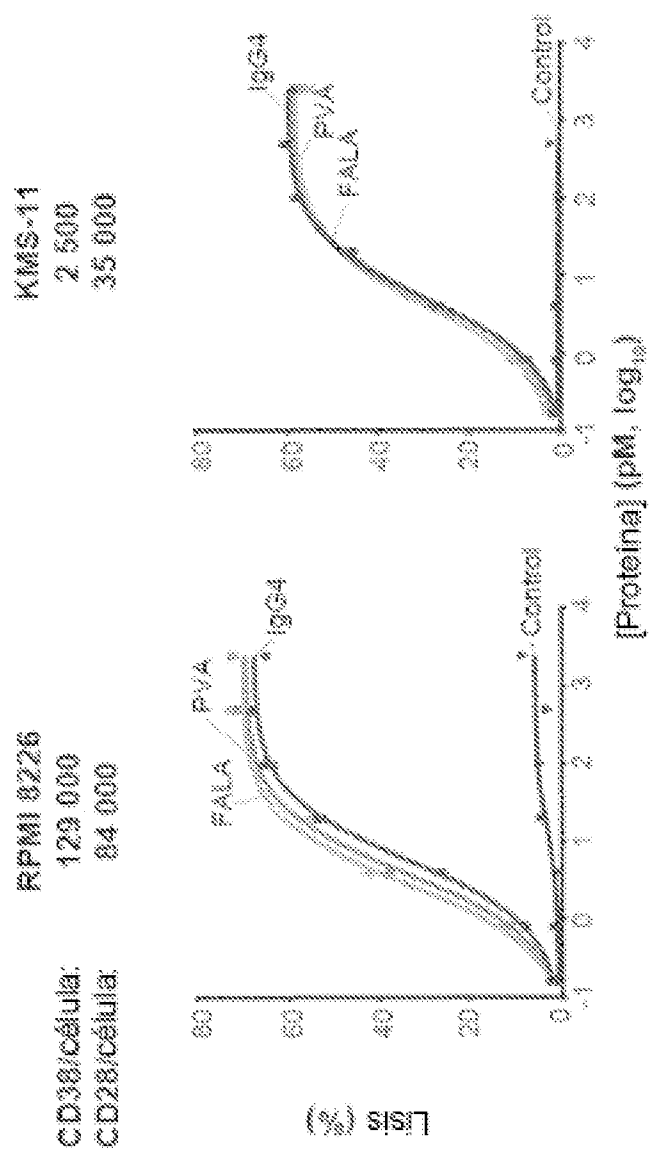


FIG. 35

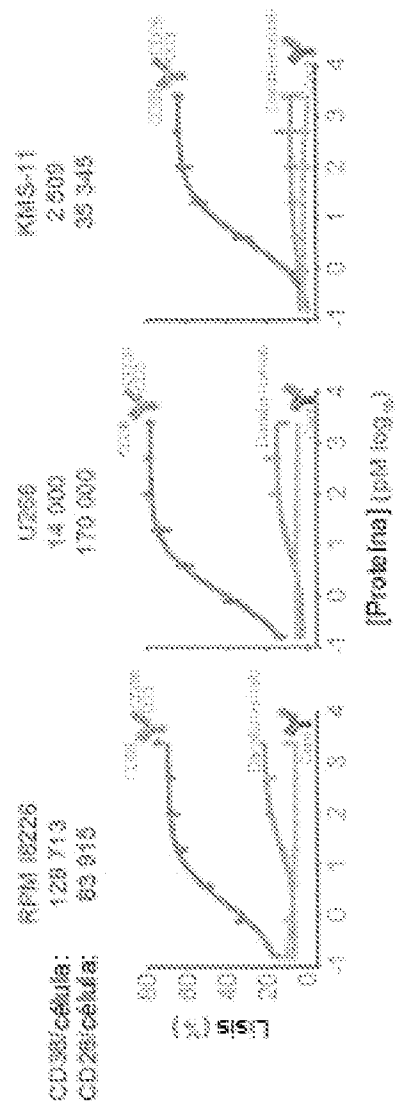


FIG. 36

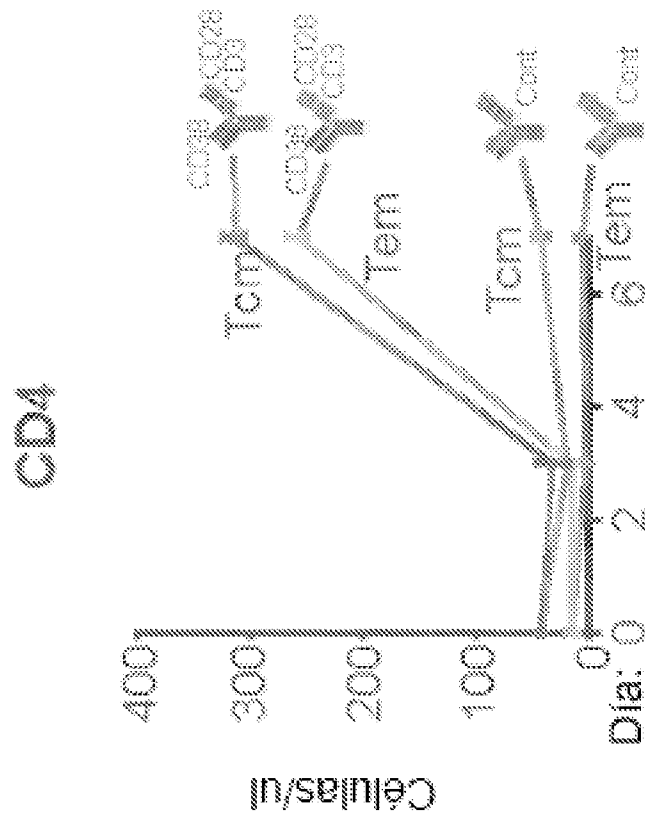


FIG. 37A

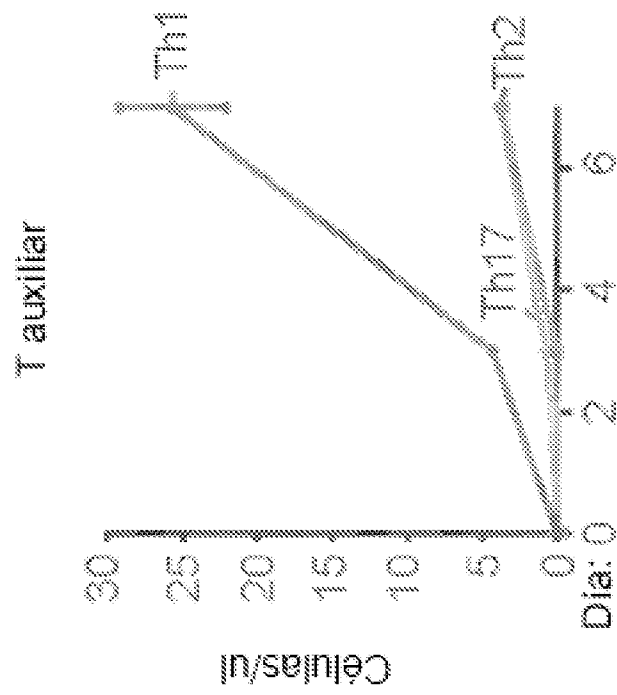


FIG. 37B

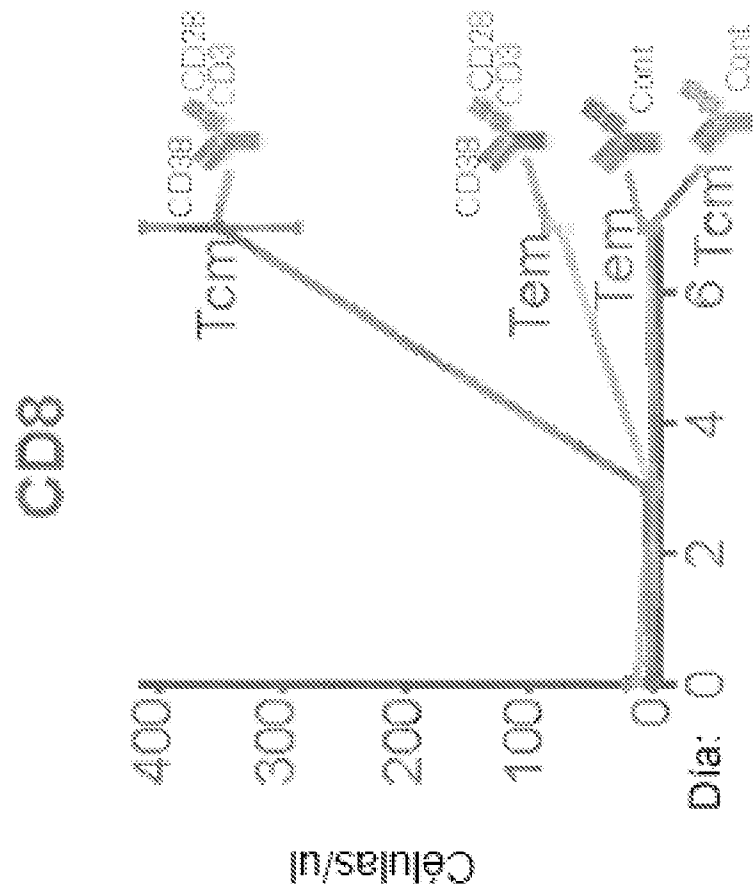


FIG. 37C

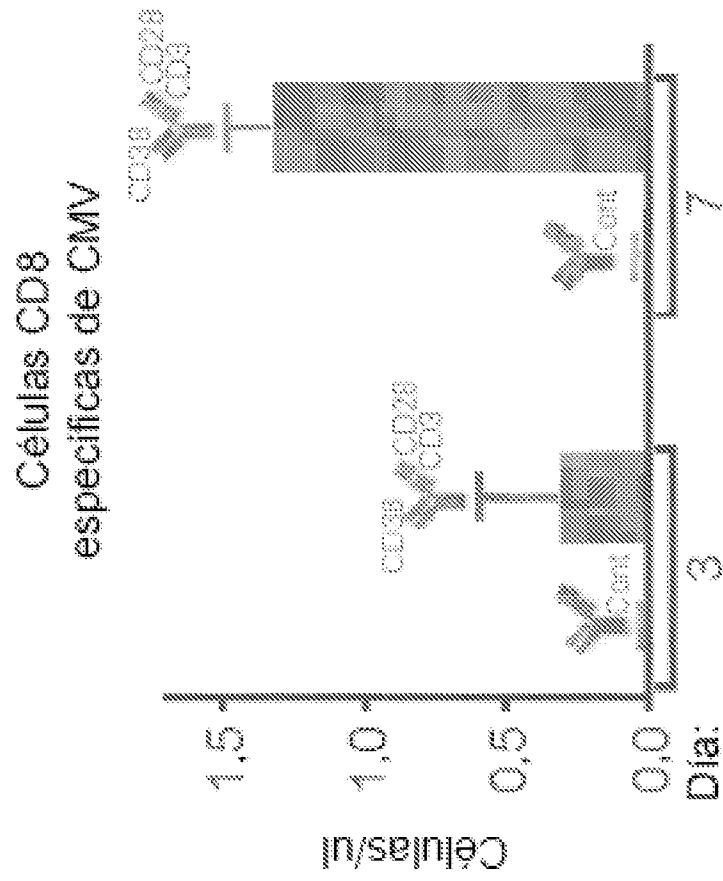


FIG. 37D

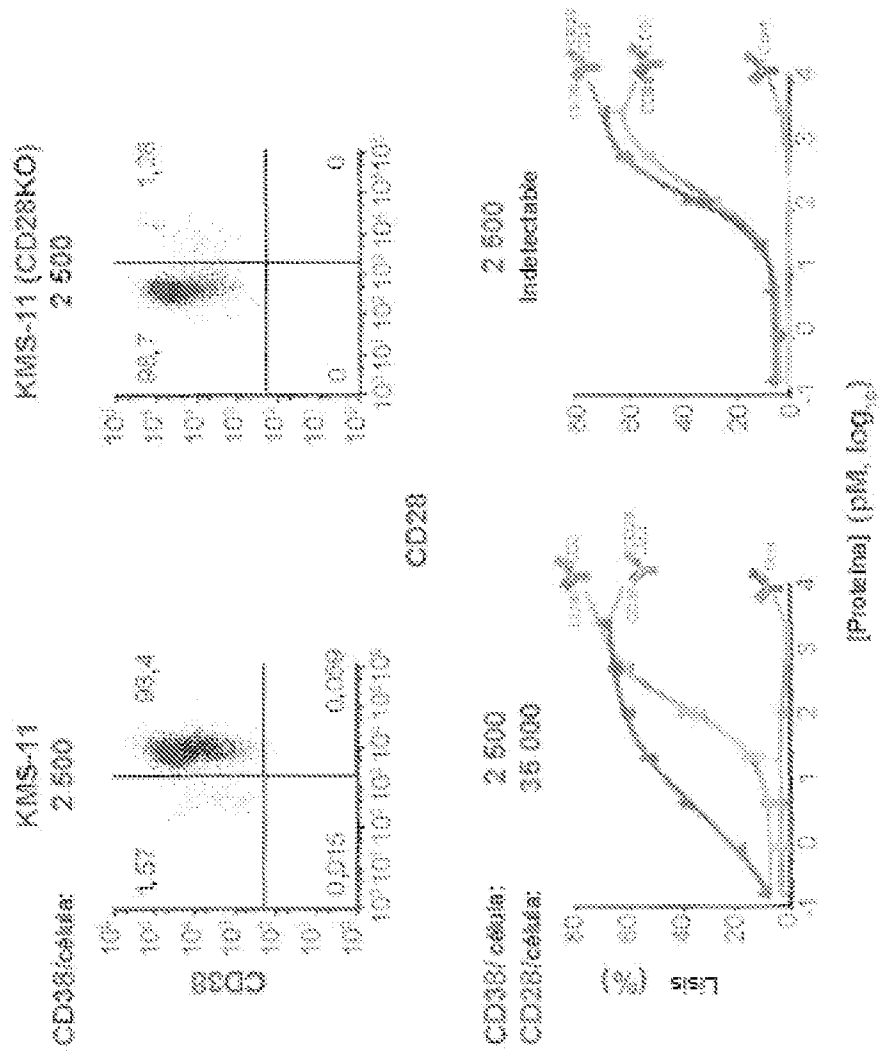


FIG. 38

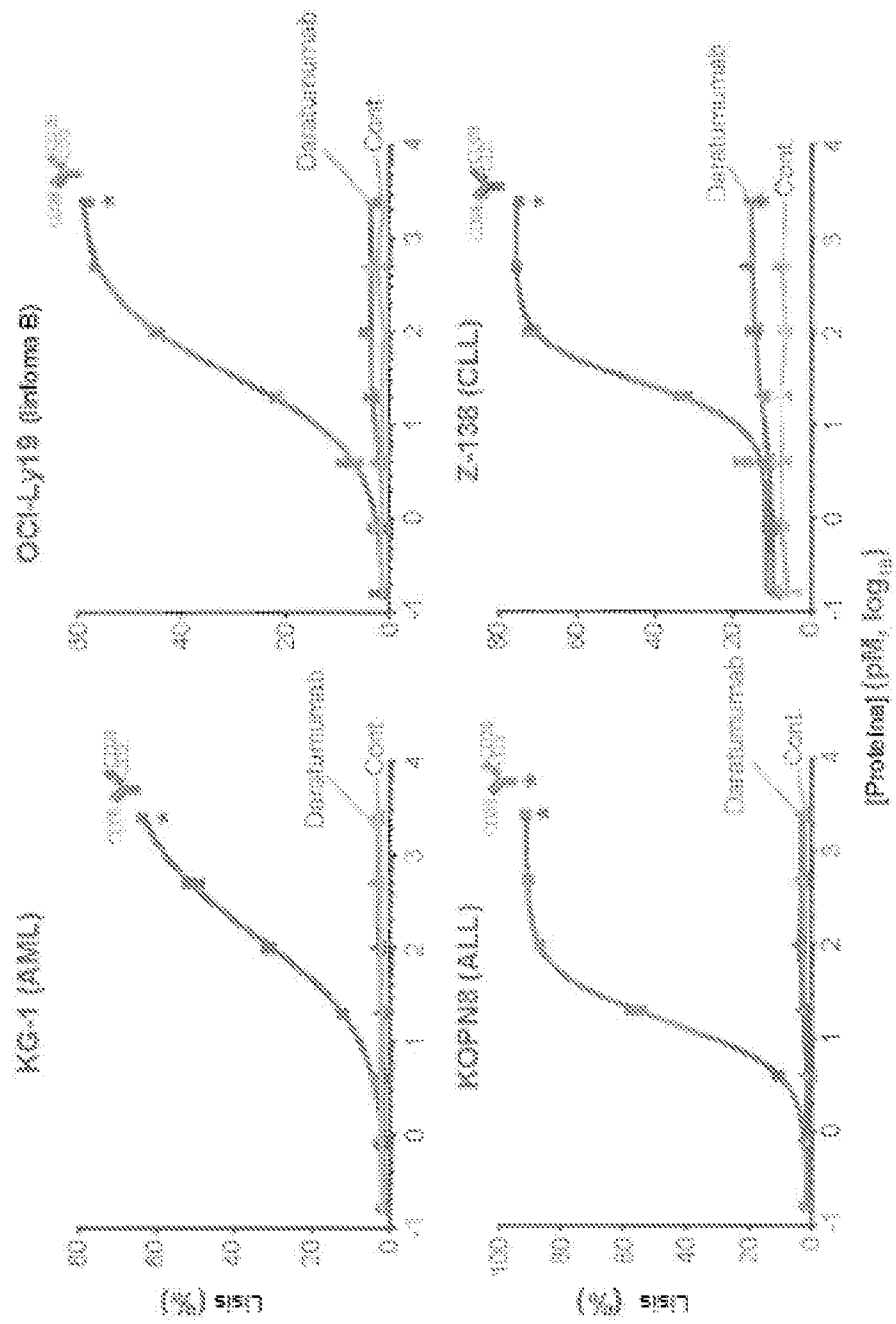


FIG. 39

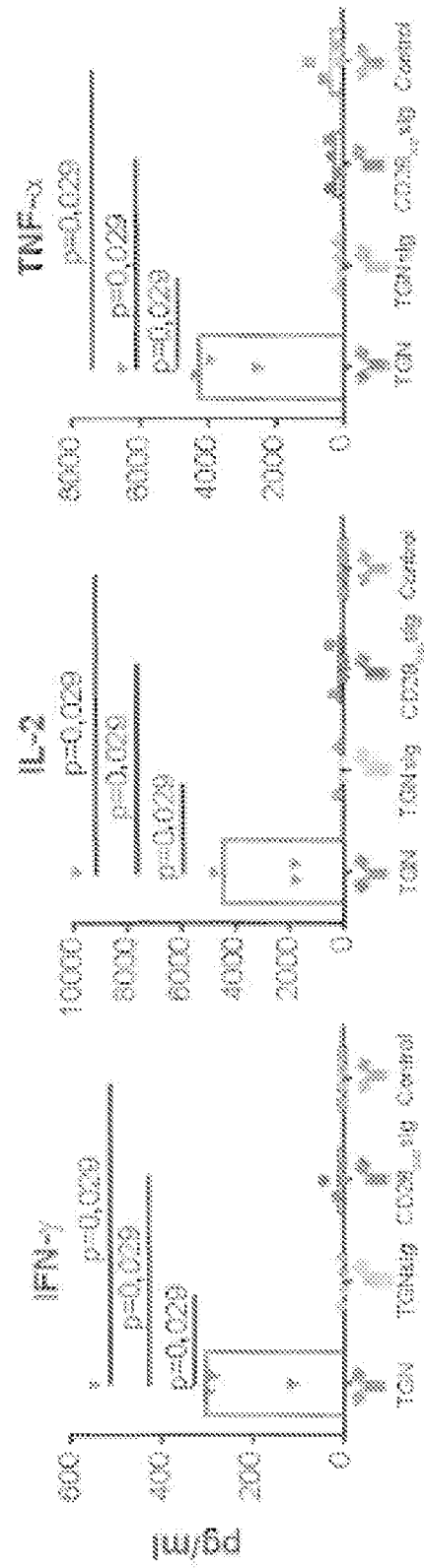


FIG. 40