

PROTEÍNAS DE UNIÓN ANTI-CD38, ANTI-CD28, AND ANTI-CD3 TRIESPECÍFICAS Y MÉTODOS DE USO PARA TRATAR UNA INFECCIÓN VIRAL

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2018/055084, presentada el 9 de octubre de 2018; la Solicitud Provisional de EE.UU. Núm. 62/831.572, presentada el 9 de abril de 2019; la Solicitud Provisional de EE.UU. Núm. 62/831.608, presentada el 9 de abril de 2019; y la Solicitud EP Núm. 19306097.7, presentada el 11 de septiembre de 2019; todas las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad.

PRESENTACIÓN DE LA LISTA DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

[0002] El contenido de la siguiente presentación en un archivo de texto ASCII se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad: un formato legible por ordenador (CRF) de la Lista de Secuencias (nombre de archivo: 18395203210SEQLIST.TXT, fecha de registro: 2 de octubre de 2019, tamaño: 144 KB).

CAMPO

[0003] La divulgación se refiere a métodos de uso de proteínas de unión triespecíficas que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a un polipéptido CD38 (p. ej., polipéptidos CD38 humano y/o de mono cinomolgo), un polipéptido CD28 y un polipéptido CD3 para expandir células T de memoria (p. ej., células T de memoria específicas de virus) y/o tratar una infección viral crónica.

ANTECEDENTES

[0004] Como parte de la inmunidad adaptativa humana, la inmunidad de las células T juega un papel crucial en el control de la infección viral, eliminando las células infectadas que resultan en el aclaramiento de la infección viral. En enfermedades infecciosas crónicas tales como la infección viral por herpes (HSV, CMV, EBV, etc.), VIH y VHB, los virus

establecen su persistencia en los seres humanos mediante diversos mecanismos que incluyen la inmunosupresión, el agotamiento de las células T y el establecimiento de la latencia. Sin embargo, la infección viral generalmente induce inmunidad específica de antígeno viral, incluidas las células T CD8 específicas de antígeno que pueden reconocer fácilmente las células infectadas para controlarlas o destruirlas mediante liberación de citocinas o procesos de muerte mediados por células T citotóxicas (CTL).

[0005] Por tanto, la activación y/o amplificación de células T específicas de antígeno viral *in vivo* y/o *ex vivo* pueden proporcionar estrategias terapéuticas contra infecciones virales crónicas.

BREVE COMPENDIO

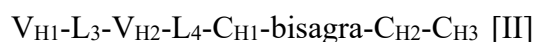
[0006] En la presente memoria se proporcionan anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD28×CD3 que se desarrollaron y evaluaron por su potencial para activar las células T y la posterior proliferación y/o amplificación de las células T específicas de antígeno. Estos Ab triespecíficos pueden expandir eficazmente las poblaciones de memoria y efectoras CD4 y CD8, incluidas las células de memoria central y memoria efectora CD8 T específicas de antígeno *in vitro*. Específicamente, se demostró la expansión *in vitro* de células de memoria central y de memoria efectora CD8 específicas de CMV, EBV, VIH-1, influenza. Los anticuerpos triespecíficos anti-CD38/CD28×CD3 descritos en la presente memoria exhibieron propiedades novedosas al acoplar CD3/CD28/CD38, proporcionando vías de señalización para estimular y expandir las células T, que pueden ofrecer una estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas tales como HSV, CMV, EBV, VIH-1 y VHB.

[0007] Para satisfacer estas y otras necesidades, se proporcionan en la presente memoria proteínas de unión que se unen a un polipéptido CD38 (por ejemplo, polipéptidos CD38 humano y de mono cinomolgo), un polipéptido CD28 y un polipéptido CD3.

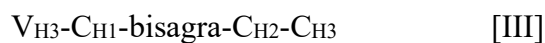
[0008] En algunas realizaciones, se proporciona en la presente memoria un método para expandir células T de memoria específicas de virus, que comprende poner en contacto una célula T de memoria específica de virus con una proteína de unión, en donde la proteína de unión comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde la primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

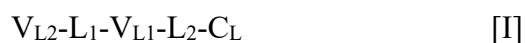
la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

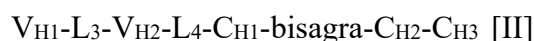
en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38

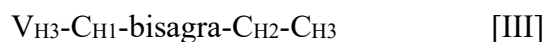
[0009] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

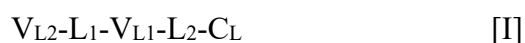
L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

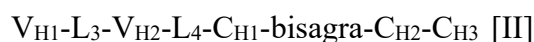
en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38 para su uso en la expansión de células T de memoria específicas de virus.

[0010] En algunas realizaciones, la célula t de memoria específica de virus se pone en contacto con la proteína de unión *in vitro* o *ex vivo*. En algunas realizaciones, el contacto de la célula t de memoria específica de virus con la proteína de unión causa activación y/o proliferación de células T de memoria específicas de virus.

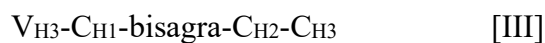
[0011] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para expandir células T, que comprende poner en contacto una célula T con una proteína de unión *in vitro* o *ex vivo*, en donde la proteína de unión comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

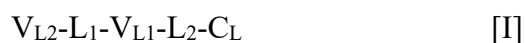
la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

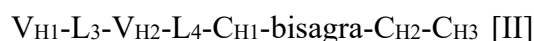
en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38.

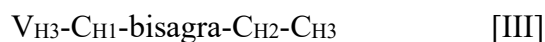
[0012] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

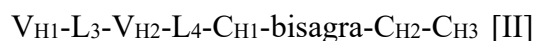
en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38 para su uso en un método para expandir células T.

[0013] En algunas realizaciones, la célula T es una célula T de memoria o una célula T efectora. En algunas realizaciones, la célula T expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) sobre su superficie celular o comprende un polinucleótido que codifica un CAR.

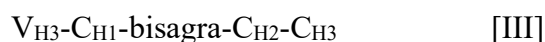
[0014] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un método para tratar una infección viral crónica, que comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de una proteína de unión, en donde la proteína de unión comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

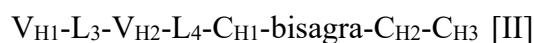
en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38.

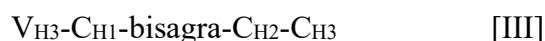
[0015] En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión que comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:

en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

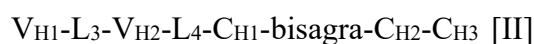
la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2}; y

L₁, L₂, L₃ y L₄ son enlazadores aminoacídicos;

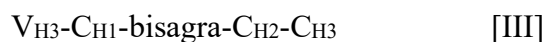
en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38 para su uso en un método para tratar una infección viral crónica, en donde dicho método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de la proteína de unión. En algunas realizaciones, en la presente memoria se proporciona una proteína de unión para su uso en un método para tratar una infección viral crónica, en donde dicho método comprende administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de la proteína de unión, en donde la proteína de unión comprende cuatro cadenas de polipéptidos que forman los tres sitios de unión a antígeno, en donde una primera cadena de polipéptido de la proteína de unión comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido de la proteína de unión comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido de la proteína de unión comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido de la proteína de unión comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

en donde el polipéptido de fórmula I y el polipéptido de fórmula II forman un par cruzado de cadena ligera-cadena pesada y

en donde V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38.

[0016] En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, la proteína de unión se administra al individuo en una formulación farmacéutica que comprende la proteína de unión y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la administración de la proteína de unión da como resultado la activación y/o proliferación de células T de memoria específicas de virus en el individuo.

[0017] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, las células T de memoria son células T de memoria CD8⁺ o CD4⁺. En algunas realizaciones, las células T de memoria son células T de memoria central (T_{CM}) o células T de memoria efectora (T_{EM}).

[0018] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, el polipéptido CD28 es un polipéptido CD28 humano, en donde el polipéptido CD3 es un polipéptido CD3 humano, y en donde el polipéptido CD38 es un polipéptido CD38 humano.

[0019] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, el dominio V_{H3} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} 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_{L3} 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_{H3} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYG (SEQ ID NO:41), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWYDGSNK (SEQ ID NO:42), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43), y el dominio V_{L3} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QGIRND (SEQ ID NO:44), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:45), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTFTSFNMHWVKETPGQGLEWIGYIYPG NGGTNYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISLTSEDSAVYFCARTGGLRRAYFTY WGQGTLVTVS (SEQ ID NO:5), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de

aminoácidos de

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNGFMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS
NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNKEDPWTFGGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCASGYTFTSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPG
QGGTNYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDNAVYFCARTGGLRRAYFTY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:13), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de

aminoácidos de

DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSYGQGMHWYQQKPGQPPRLLIYGASS
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:14). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCASGYTFTSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPG
NGGTNYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDNAVYFCARTGGLRRAYFTY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:17), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de

aminoácidos de

DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASS
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:18). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCASGYTFTSFNMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPG
NGGTNYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDNAVYFCARTGGLRRAYFTY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:21), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de

aminoácidos de

DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASS
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:18). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPG
NGGTNYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLRSEDNAVYFCARTGGLRRAYFTY
WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:23), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de

aminoácidos de

DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSYGNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASS

RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEPEDFAVYYCQQNKEDPWTFGGGGTKLEIK
(SEQ ID NO:18). En algunas realizaciones, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMFRGAFDYWG
QGTLVTVSS (SEQ ID NO:9), y el dominio V_{L3} comprende la secuencia de aminoácidos de

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQDYIYYPTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:10).

[0020] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, el dominio V_{H1} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSYY (SEQ ID NO:108), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNVNT (SEQ ID NO:109), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TRSHYGLDWNFDV (SEQ ID NO:110), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNIYVW (SEQ ID NO:111), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KAS (SEQ ID NO:112), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGQTYPY (SEQ ID NO:113). En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLSDYG (SEQ ID NO:114), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWAGGGT (SEQ ID NO:115), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARDKGYSYYYSMDY (SEQ ID NO:116), y el dominio V_{L1} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVEYYVTSL (SEQ ID NO:117), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:118), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSRKVPYT (SEQ ID NO:119). En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYYIHWVRQAPGGGLEWIGSIYPGN
VNTNYAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCTRSHYGLDWNFDV
WGKGTTVTSS (SEQ ID NO:49), y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHT

GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQGQTPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:50). En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSDYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGG
GTNYPNPSLKSRTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDKGYSYYYSMDY
WGQGTTVTVS (SEQ ID NO:51), y el dominio V_{L1} comprende la secuencia de aminoácidos de

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPLIFAAASN
VESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEANDVANYYCQQRKVPYTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO:52).

[0021] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, el dominio V_{H2} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFTKAW (SEQ ID NO:120), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IKDKSNSYAT (SEQ ID NO:121), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RGVYYALSPFDY (SEQ ID NO:122), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHNNANTY (SEQ ID NO:123), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEQ ID NO:124), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GQGTQYPFT (SEQ ID NO:125). En algunas realizaciones, el dominio V_{H2} comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFTKAW (SEQ ID NO:126), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IKDKSNSYAT (SEQ ID NO:127), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVVYYALSPFDY (SEQ ID NO:128), y el dominio V_{L2} comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHNNNGNTY (SEQ ID NO:129), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEQ ID NO:130), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GQGTQYPFT (SEQ ID NO:131). En algunas realizaciones, el dominio V_{H2} comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKD
KSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPF
DYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:53), y el dominio V_{L2} comprende la secuencia de aminoácidos de

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK
(SEQ ID NO:54). En algunas realizaciones, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKGLEWVAQIKD
KSNSYATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPF
DYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:84), y el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO:85).

[0022] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, al menos uno de L₁, L₂, L₃ o L₄ tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L₁, L₂, L₃ y L₄ tienen cada uno independientemente cero aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGGGSGGGGSGGGGS (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 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGGGSGGGGSGGGGS (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.

[0023] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-CH₂-CH₃ de IgG4, y en donde los dominios bisagra-CH₂-CH₃ comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A. En algunas realizaciones, los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-CH₂-CH₃ de IgG4, y en donde los dominios bisagra-CH₂-CH₃ comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de

aminoácidos son E233P, F234V, L235A, y una delección en 236. En algunas realizaciones, los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-CH₂-CH₃ de IgG4, y en donde los dominios bisagra-CH₂-CH₃ comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas realizaciones, los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-CH₂-CH₃ de IgG1, y en donde los dominios bisagra-CH₂-CH₃ comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235, y 329 de IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A, y P329A. En algunas realizaciones, los dominios bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son dominios bisagra-CH₂-CH₃ de IgG1, y en donde los dominios bisagra-CH₂-CH₃ comprenden cada uno sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299, y 300 de IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A, y Y300S. En algunas realizaciones, el dominio bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V; y en donde el dominio bisagra-CH₂-CH₃ de la tercera cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas realizaciones, el dominio bisagra-CH₂-CH₃ de la segunda cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; y en donde el dominio bisagra-CH₂-CH₃ de la tercera cadena polipeptídica comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 349, 366, 368, y 407 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A, y Y407V.

[0024] En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena

polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69.

[0025] En algunas realizaciones que se pueden combinar con otras realizaciones cualesquiera descritas en la presente memoria, el virus es un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la influenza, citomegalovirus (CMV), virus de la hepatitis B (VHB), virus del papiloma humano (HPV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus espumoso humano (HFV), virus del herpes simple 1 (HSV-1), o virus del herpes simple 1 (HSV-2).

[0026] Se debe entender que una, algunas o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en la presente memoria se pueden combinar para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes para un experto en la técnica. Estas y otras realizaciones de la invención se describen con más detalle mediante la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027] La **FIG. 1** proporciona una representación esquemática de una proteína de unión triespecífica 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 duales que tienen una orientación cruzada (VH1-VH2 y VL2-VL1) que forman dos sitios de unión al antígeno que reconocen CD3 y CD28, y un segundo par de polipéptidos posee un dominio variable único (VH3 y VL3) que forman un único sitio de unión al antígeno que reconoce CD38. La proteína de unión triespecífica mostrada en la **FIG. 1** utiliza una región constante de IgG4 con una mutación de "botones en ojales", donde el botón está en el segundo par de polipéptidos con un solo dominio variable.

[0028] La **FIG. 2** resume las afinidades de unión de las proteínas de unión triespecíficas indicadas contra sus antígenos afines (CD3, CD28 y CD38 humanas) medidas mediante SPR.

[0029] La **FIG. 3** resume la afinidad de unión de las proteínas de unión triespecíficas anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 indicadas para CD38 humana, medida mediante SPR o citometría de flujo (FACS).

[0030] Las **FIG. 4A-4D** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en respuesta a anticuerpos triespecíficos CD38VH1/CD3midxCD28sup. La evaluación de la expansión del subconjunto de células T se realizó recubriendo los pocillos con 350 ng/pocillo del Ab triespecífico contra CD38 en ausencia de citocinas exógenas. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó como control negativo un Ab triespecífico que tenía tres dominios de unión a antígeno mutados. Se utilizó citometría de flujo para determinar células T CD4 centrales (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) (**FIG. 4A**), células T auxiliares (Th1, Th17, Th2) (**FIG. 4B**), centrales (T_{cm}) y células T CD8 de memoria efectora (T_{em}) (**FIG. 4C**) y células CD8 específicas de pp65 de citomegalovirus (CMV) (**FIG. 4D**) como se describe en el Ejemplo 3. El análisis de células efectoras pp65 específicas de CMV se realizó mediante tinción con pentámeros de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes HLA-A2 CMV+ tratados con los anticuerpos de control triespecífico contra CD38 o triple negativo.

[0031] Las **FIG. 5A-5B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante B infectado con CMV en respuesta

al anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo triespecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar células T CD8⁺ de memoria específicas de CMV (**FIG. 5A**), así como células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de CMV (**FIG. 5B**). El anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de CMV.

[0032] Las **FIG. 6A-6B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante C infectado con CMV en respuesta al anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo triespecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar células T CD8⁺ de memoria específicas de CMV (**FIG. 6A**), así como células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de CMV (**FIG. 6B**). El anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de CMV.

[0033] Las **FIG. 7A-7B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante A infectado con el virus de Epstein-Barr (EBV) en respuesta al anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo triespecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV (**FIG. 7A**), así como células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de EBV (**FIG. 7B**). El anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}, activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV.

[0034] Las **FIG. 8A-8B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante B infectado con EBV en respuesta al anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo triespecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV (**FIG. 8A**), así como células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de EBV (**FIG. 8B**). El anticuerpo triespecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}, activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV.

[0035] La **FIG. 9** muestra perfiles de citometría de flujo de PBMC de los donantes positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) indicados (paneles inferiores y panel superior derecho) analizados para células T CD8⁺ específicas de Gag de VIH (A*02:01 — SLYNTVATL (gag de VIH-1 p17 76-84) Pentámero conjugado con PE, ProImmune) al inicio (día 0; antes de la incubación con anticuerpos específicos). Se utilizaron PBMC de un donante negativo para VIH como control negativo (panel superior izquierdo). Los porcentajes de la población de células T CD8⁺ específicas de Gag se proporcionan y se muestran como recuadros. Al inicio, las PBMC de donantes positivos para VIH contienen células T CD8⁺ específicas de Gag de VIH. Los donantes A-C en la **FIG. 9** son los mismos que los donantes D-F mostrados en las **FIG. 10A-12B**.

[0036] Las **FIG. 10A-10B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante D positivo para VIH en respuesta al anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo trispecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar las células T CD8⁺ de memoria específicas de VIH (**FIG. 10A**), así como las células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de VIH (**FIG. 10B**). El anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}, activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria efectora (T_{em}).

[0037] Las **FIG. 11A-11B** muestran la caracterización de la expansión de subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante E positivo para VIH en respuesta al anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo trispecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar las células T CD8⁺ de memoria específicas de VIH (**FIG. 11A**), así como las células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de VIH (**FIG. 11B**). El anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}, activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria efectora (T_{em}).

[0038] Las **FIG. 12A-12B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recogidas del donante F positivo para VIH en respuesta al anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo trispecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar las células T CD8⁺ de memoria específicas de VIH (**FIG. 12A**), así como las células T CD8⁺ de

memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de VIH (**FIG. 12B**). El anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}, activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria efectora (T_{em}).

[0039] Las **FIG. 13A-13B** muestran la caracterización de la expansión del subconjunto de células T *in vitro* en PBMC recolectadas de un Donante A infectado con influenza en respuesta al anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid}. Las poblaciones de células T se midieron en los puntos de tiempo indicados. Se utilizó el anticuerpo trispecífico triple mutante como control negativo. Se utilizó citometría de flujo para cuantificar las células T CD8⁺ de memoria específicas de influenza (gripe) (**FIG. 13A**), así como las células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) y de memoria efectora (T_{em}) específicas de influenza (**FIG. 13B**). El anticuerpo trispecífico CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células CD8⁺ T_{em} (p. ej., véanse los días 7, 11) y células T CD8⁺ T_{cm} (p. ej., véase el día 7).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0040] La divulgación proporciona proteínas de unión trispecíficas que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen específicamente a un polipéptido CD38 (p. ej., polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo), a un polipéptido CD28, y a un polipéptido CD3, que pueden encontrar uso, p. ej., para expandir células T de memoria (p. ej., células T de memoria específicas de virus) y/o tratar una infección viral crónica.

I. Definiciones Generales

[0041] Tal como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de tales moléculas y similares.

[0042] Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la presente divulgación descritas en la presente memoria incluyen aspectos y realizaciones de "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en".

[0043] El término "polinucleótido", como se emplea en la presente memoria, se refiere a polímeros de ácido nucleico de hebra sencilla o de doble hebra de al menos 10 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que comprenden el polinucleótido pueden ser ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. Tales modificaciones incluyen modificaciones de bases tales como bromuridina, modificaciones de ribosa tales como arabinósido y 2',3'-didesoxirribosa, y modificaciones de conexiones internucleotídicas tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato y fosforamidato. El término "polinucleótido" incluye específicamente formas de ADN de hebra sencilla y de doble hebra.

[0044] Un "polinucleótido aislado" es un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que: (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el polinucleótido aislado se encuentra en la naturaleza, (2) está conectado a un polinucleótido al que no está conectado en la naturaleza, o (3) no se encuentra en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

[0045] Un "polipéptido aislado" es uno que: (1) está libre de al menos algunos otros polipéptidos con los que normalmente se encontraría, (2) está esencialmente libre de otros polipéptidos de la misma fuente, por ejemplo, de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, (4) se ha separado de al menos aproximadamente 50 por ciento de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está asociado en la naturaleza, (5) no está asociado (por interacción covalente o no covalente) con porciones de un polipéptido con el que el "polipéptido aislado" está asociado en la naturaleza, (6) está asociado operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está asociado en la naturaleza, o (7) no se encuentra en la naturaleza. Tal 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 tipo).

[0046] Los anticuerpos de origen natural comprenden típicamente un tetrámero. Cada uno de tales tetrámeros está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas

polipeptídicas, cada par tiene 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). Los términos "cadena pesada" y "cadena ligera", como se emplean en la presente memoria, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tenga suficiente secuencia de dominio variable para conferir especificidad por un antígeno diana. La porción amino-terminal de cada cadena ligera y pesada típicamente incluye un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente es responsable del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define típicamente un dominio constante responsable de la función efectora. Por lo tanto, en un anticuerpo de origen natural, un polipéptido de inmunoglobulina de 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 amino del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el extremo carboxilo, y un polipéptido de inmunoglobulina de 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 amino terminal del polipéptido y el dominio C_L está en el extremo carboxilo terminal.

[0047] 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. La IgG tiene varias subclases, que incluyen, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases que incluyen, entre otras, IgM1 e IgM2. La IgA se subdivide de manera similar en subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variable y constante típicamente están unidos por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, por ejemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul, W., ed., Raven Press, 2ª ed., 1989), que se incorpora como referencia en su totalidad para todos los propósitos. Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas típicamente forman un sitio de unión a antígeno. Los dominios variables de los anticuerpos de origen natural exhiben típicamente la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par típicamente están alineadas por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un

epítopo específico. Desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal, los dominios variables de cadena ligera y pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

[0048] El término "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente según los diferentes sistemas. 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 restos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de restos precisos 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) encontraron que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. 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 han descrito otros límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat. Otras definiciones más de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas de la presente memoria, pero no obstante se solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o hallazgos experimentales de que determinados restos o grupos de restos o incluso CDR completas no repercuten significativamente en la unión del antígeno. Los métodos utilizados en la presente memoria pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones utilizan CDR definidas por Kabat o Chothia. La identificación de las CDR predichas utilizando 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," *In Antibody Engineering*, Vol. 2. Kontermann R., Dübel S., eds. Springer-Verlag, Berlin, pág. 33–51 (2010). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada y/o ligera también puede inspeccionarse para identificar las secuencias de las CDR mediante otros métodos convencionales, por ejemplo, mediante comparación con secuencias de aminoácidos conocidas de otras regiones variables de cadena ligera y pesada para

determinar las regiones de hipervariabilidad de secuencia. Las secuencias numeradas pueden alinearse visualmente o empleando un programa de alineamiento tal como uno de los programas de CLUSTAL, como describen Thompson, 1994, en *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80. Los modelos moleculares se utilizan convencionalmente para delinear correctamente las regiones marco y CDR y así corregir las asignaciones basadas en secuencias.

[0049] En algunas realizaciones, la definición de CDR/FR en una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina se determina basándose en la definición de IMGT (Lefranc et al. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

[0050] El término "Fc", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento que no se une al antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producido por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es preferiblemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas. Las moléculas Fc están formadas por polipéptidos monoméricos que se pueden unir en formas dimericas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas varía de 1 a 4 según la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2 e IgG4). Un ejemplo de Fc es un dímero unido por enlaces disulfuro resultante de la digestión de una IgG con papaína.

[0051] Un fragmento F(ab) típicamente incluye una cadena ligera y los dominios V_H y C_{H1} de una cadena pesada, en donde la porción de cadena pesada V_H-C_{H1} del fragmento F(ab) no puede formar un enlace disulfuro con otro polipéptido de cadena pesada. Como se utiliza en la presente memoria, un fragmento F(ab) también puede incluir una cadena ligera que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y una cadena pesada que contiene dos dominios variables separados por un enlazador de aminoácidos y un dominio C_{H1}.

[0052] Un fragmento F(ab') típicamente incluye una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene más de la región constante (entre los dominios C_{H1} y C_{H2}), de modo que se puede formar un enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

[0053] El término "proteína de unión" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula de origen no natural (o recombinante o manipulada) que se une

específicamente a al menos un antígeno diana, por ejemplo, un polipéptido CD38 de la presente divulgación.

[0054] Una molécula "recombinante" es aquella que se ha preparado, expresado, creado o aislado por medios recombinantes.

[0055] Una realización de la divulgación proporciona proteínas de unión que tienen especificidad biológica e inmunológica 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 tales 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 tales proteínas de unión. Otra realización más de la divulgación proporciona células anfitrionas que expresan tales proteínas de unión (es decir, que comprenden moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican cadenas polipeptídicas que forman tales proteínas de unión).

[0056] El término "permutabilidad", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la intercambiabilidad de dominios variables dentro del formato de la proteína de unión y con la conservación del plegamiento y la afinidad de unión final. "Permutabilidad total" se refiere a la capacidad de permutar el orden de los 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) a la vez que se mantiene la funcionalidad completa de la proteína de unión, como lo demuestra la conservación de la afinidad de unión. Además, cabe señalar que las designaciones V_H y V_L se refieren únicamente a la ubicación del dominio en una cadena de proteínas en particular en el formato final. Por ejemplo, V_{H1} y V_{H2} podrían obtenerse de los dominios V_{L1} y V_{L2} en los anticuerpos parentales y colocarse en las posiciones V_{H1} y V_{H2} de la proteína de unión. Asimismo, V_{L1} y V_{L2} podrían obtenerse de los dominios V_{H1} y V_{H2} en los anticuerpos parentales y colocarse en las posiciones V_{H1} y V_{H2} en la proteína de unión. Por lo tanto, las designaciones V_H y V_L se refieren a la ubicación actual y no a la ubicación original en un anticuerpo parental. Por lo tanto, los dominios V_H y V_L son "permutables".

[0057] El término "antígeno" o "antígeno diana" o "diana antigénica" como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de unirse a una proteína de unión y, además, puede utilizarse en un animal para producir anticuerpos capaces de 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 es capaz de competir con un anticuerpo intacto que reconoce el antígeno diana.

[0058] "CD38" es el polipéptido del cúmulo de diferenciación 38 y es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de muchas células inmunitarias. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une al dominio extracelular de uno o más polipéptidos CD38. Las secuencias de polipéptido del dominio extracelular de CD38 ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, el dominio extracelular de CD38 humano (p. ej., representado por SEQ ID NO: 1) y el dominio extracelular de CD38 de mono cinomolgo (p. ej., representado por SEQ ID NO: 30).

[0059] El término "acoplador de células T" se refiere a proteínas de unión dirigidas al sistema inmunológico de un anfitrión, más específicamente a la actividad citotóxica de las células T, así como a una proteína diana del tumor.

[0060] El término "proteína de unión monoespecífica" se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a un antígeno diana.

[0061] El término "proteína de unión monovalente" se refiere a una proteína de unión que tiene un sitio de unión a antígeno.

[0062] El término "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 epítomos diferentes en el mismo antígeno.

[0063] El término "proteína de unión bivalente" se refiere a una proteína de unión que tiene dos sitios de unión.

[0064] El término "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 epítomos diferentes sobre el mismo antígeno.

[0065] El término "proteína de unión trivalente" se refiere a una proteína de unión que tiene tres sitios de unión. En realizaciones concretas, 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.

[0066] Una proteína de unión "aislada" es aquella que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de la proteína de unión y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, la proteína de unión se purificará: (1) hasta más de 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener a al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. Las proteínas de unión aisladas incluyen la proteína de unión *in situ* dentro de las células recombinantes puesto que no estará presente al menos un componente del entorno natural de la proteína.

[0067] Los términos "sustancialmente puro" o "sustancialmente purificado" como se emplean en la presente memoria se refieren a un compuesto o especie que es la especie predominante presente (es decir, sobre 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 50% (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En otras realizaciones, una composición sustancialmente pura comprenderá más de 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. En otras realizaciones más, la especie se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

[0068] El término "epítipo" incluye cualquier determinante, preferiblemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que se une a un anticuerpo o proteína de unión. En ciertas 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 lo más preferiblemente cuando la constante de disociación es $\leq 10^{-10}$ M.

[0069] La constante de disociación (K_D) de una proteína de unión se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón de superficie. Generalmente, el análisis de resonancia de plasmón de superficie mide las interacciones de unión en tiempo real entre el ligando (un antígeno diana en una matriz de biosensor) y el analito (una proteína de unión en solución) por resonancia de plasmón de superficie (SPR) utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). El análisis de plasmón de superficie también se puede realizar inmovilizando el analito (proteína de unión en una matriz de biosensor) y presentando el ligando (antígeno diana). El término " K_D ", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la constante de disociación de la interacción entre una proteína de unión concreta y un antígeno diana.

[0070] El término "se une a" como se emplea en la presente memoria 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 para 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 para unirse a un epítipo con una afinidad que sea 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 mono cinomolgo.

[0071] En algunas realizaciones, un dominio de unión y/o proteína de unión a antígeno de la presente divulgación "reacciona de forma cruzada" con polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo, p. ej., dominios extracelulares de CD38, tales como SEQ ID NO: 1 (isoforma A de CD38 humana), SEQ ID NO: 105 (isoforma E de CD38 humana) y SEQ ID NO: 30 (CD38 de mono cinomolgo). Una proteína de unión de unión a antígeno 1 (Ag1) presenta "reacción cruzada" en el antígeno 2 (Ag2) cuando las CE_{50} están en un intervalo similar para ambos antígenos. En la presente solicitud, una proteína de unión que se une a Ag1 tiene reactividad cruzada con Ag2 cuando la razón entre la afinidad de Ag2 y la afinidad de Ag1 es igual o menor que 10 (por ejemplo, 5, 2, 1 o 0,5), midiéndose las afinidades con el mismo método para ambos antígenos.

[0072] Una proteína de unión que se une a Ag1 "no presenta una reacción cruzada significativa" con 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, una proteína de unión que se une a Ag1 no presenta una reacción cruzada significativa con Ag2, cuando la respuesta de unión de la proteína de unión a Ag2 es menos de 5% de la respuesta de unión de la misma proteína de unión a Ag1 en el mismo entorno experimental y a la misma concentración de anticuerpos. En la práctica, la concentración de proteína de unión utilizada puede ser la CE_{50} o la concentración requerida para alcanzar la meseta de saturación obtenida con Ag1.

[0073] El término "enlazador", como se emplea en la presente memoria, se refiere a uno o más restos de aminoácidos insertados entre dominios de inmunoglobulina para proporcionar suficiente movilidad para que los dominios de las cadenas ligera y pesada se plieguen en inmunoglobulinas de región variable dual cruzada. Se inserta un enlazador en la transición entre dominios variables o entre dominios variables y constantes, respectivamente, a nivel de secuencia. La transición entre dominios se puede identificar ya que se conoce bien el tamaño aproximado de los dominios de inmunoglobulina. La ubicación precisa de una transición de dominio se puede determinar localizando tramos de péptidos que no forman elementos estructurales secundarios tales como láminas beta o hélices alfa, como lo demuestran los datos experimentales o como se puede suponer mediante técnicas de modelado o predicción de estructuras secundarias. Los enlazadores descritos en la presente memoria son referidos como L₁, que se encuentra en la cadena ligera entre el extremo C-terminal de V_{L2} y el extremo N-terminal del dominio V_{L1}; y L₂, que se encuentra en la cadena ligera entre el extremo C-terminal de V_{L1} y el extremo N-terminal del dominio C_L. Los enlazadores de cadena pesada se conocen como L₃, que se encuentra entre el extremo C-terminal del dominio V_{H1} y el extremo N-terminal del dominio V_{H2}; y L₄, que se encuentra entre el extremo C-terminal del V_{H2} y el extremo N-terminal del dominio C_{H1}.

[0074] El término "vector", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula (p. ej., ácido nucleico, plásmido o virus) que se utiliza para transferir información de codificación a una célula anfitriona. El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN de doble hebra circular en la que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales en el

genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante se encuentran a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria, ya que un plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, se pretende que la descripción incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación defectuosa), que cumplen funciones equivalentes.

[0075] La frase "célula anfitriona recombinante" (o "célula anfitriona") como se emplea en la presente memoria se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se pretende que una célula anfitriona recombinante o una célula anfitriona se refieran no sólo a la célula objeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula madre, pero tales células todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria. Se puede utilizar una amplia variedad de sistemas de expresión de células anfitrionas para expresar las proteínas de unión, incluidos los sistemas de expresión bacterianos, de levadura, baculovirales y de mamíferos (así como los sistemas de expresión de presentación en fagos). Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC19. Para expresar una proteína de unión de manera recombinante, una célula anfitriona 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 manera que las cadenas polipeptídicas se expresan en la célula anfitriona y, preferiblemente, se secretan al medio en el que se cultivan las células anfitrionas, de cuyo medio se puede recuperar la proteína de unión.

[0076] El término "transformación", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente desde su estado nativo. Después de la transformación, el ADN transformante se puede recombinar con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, o se puede mantener transitoriamente como un elemento episomal sin replicarse, o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término "transfección", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Varios mecanismos de transfección son bien conocidos en la técnica. Estos mecanismos se pueden utilizar para introducir una o más moléculas de ADN exógenas en células anfitrionas adecuadas.

[0077] El término "de origen natural", como se emplea en la presente memoria y se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza y no ha sido manipulado por el hombre. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que está presente en un organismo (incluidos los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre es de origen natural. De manera similar, "de origen no natural", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un objeto que no se encuentra en la naturaleza o que ha sido modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

[0078] Como se emplea en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Los estereoisómeros (p. ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales; los aminoácidos no naturales y análogos tales como aminoácidos α,α -disustituidos, los N-alquil aminoácidos, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la notación polipeptídica utilizada en la presente memoria, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxilo terminal según el uso y la convención normales.

[0079] Los restos de origen natural se pueden dividir en clases según las 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) alcalinos: His, Lys, Arg;
- (8) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (9) aromáticos: His, Trp, Tyr, Phe; y
- (10) aromáticos hidrófobos: Phe, Trp, Tyr.

[0080] Las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase. Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

[0081] Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de unión utilizando mecanismos bien conocidos. Por ejemplo, un experto en la técnica puede identificar zonas adecuadas de una cadena polipeptídica que se pueden cambiar sin destruir la actividad localizando regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. Alternativamente, un experto en la técnica puede identificar restos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Además, incluso las zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservativas de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

[0082] El término "paciente", como se emplea en la presente memoria, incluye sujetos humanos y animales (p. ej., mamíferos, tales como perros, cerdos, caballos, gatos, vacas, etc.).

[0083] Los términos "tratamiento" o "tratar" como se emplean en la presente memoria se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que tienen un trastorno, así como aquellos que son propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. En realizaciones concretas, las proteínas de unión se pueden utilizar

para tratar seres humanos con infección viral crónica o mejorar la infección viral crónica en un sujeto humano.

[0084] Los términos "composición farmacéutica" o "composición terapéutica" como se emplean en la presente memoria se refieren a un compuesto o composición capaces de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administran adecuadamente a un paciente.

[0085] Los términos "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador fisiológicamente aceptable" como se emplean en la presente memoria se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para lograr o mejorar la liberación de una proteína de unión.

[0086] Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" cuando se utilizan en referencia a una composición farmacéutica que comprende una o más proteínas de unión se refieren a una cantidad o dosificación 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 algún período de tiempo, uno o más de los procesos patológicos clínicamente definidos asociados con la afección que se está tratando. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la proteína de unión específica que se esté utilizando, y también depende de una variedad de factores y condiciones relacionadas con el paciente que está siendo tratado y la gravedad del trastorno. Por ejemplo, si la proteína de unión se va a administrar in vivo, factores como la edad, el peso, y la salud del paciente, así como las curvas de dosis-respuesta y los datos de toxicidad obtenidos en el trabajo preclínico con animales, estarían entre los factores considerados. La determinación de una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica dada está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

[0087] Una realización de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión.

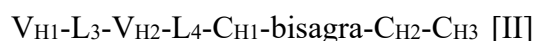
Proteínas de Unión Triespecíficas

[0088] Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a proteínas de unión triespecíficas (p. ej., que se unen a polipéptidos CD38, CD28 y CD3). Cualquiera de las CDR o dominios variables de cualquiera de las proteínas de unión a antígeno descritas en la presente memoria puede encontrar uso en una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación.

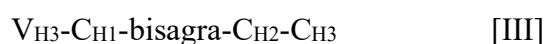
[0089] En algunas realizaciones, la proteína de unión de la divulgación es una proteína de unión trispecífica que comprende cuatro cadenas polipeptídicas que forman tres sitios de unión a antígeno que se unen a una o más (p. ej., tres) dianas antigénicas o proteínas diana diferentes. En algunas realizaciones, una primera cadena polipeptídica comprende una estructura representada por la fórmula:



y una segunda cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una tercera cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



y una cuarta cadena de polipéptido comprende una estructura representada por la fórmula:



en donde:

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

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

V_{L3} es un tercer dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

V_{H3} es un tercer dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

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

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

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

la bisagra es una región bisagra de inmunoglobulina que conecta los dominios C_{H1} y C_{H2} ; y

L_1 , L_2 , L_3 y L_4 son enlazadores aminoacídicos;

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, la primera cadena polipeptídica y la segunda cadena polipeptídica tienen una orientación cruzada que forma dos sitios de unión a antígeno distintos.

[0090] En algunas realizaciones, V_{H1} y V_{L1} forman un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, en donde V_{H2} y V_{L2} forman un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y en donde V_{H3} y V_{L3} forman un tercer sitio de

unión a antígeno que se une a un polipéptido CD38. En algunas realizaciones, el polipéptido CD28 es un polipéptido CD28 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido CD3 es un polipéptido CD3 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido CD38 es un polipéptido CD38 humano. En algunas realizaciones, la proteína de unión trispecífica comprende uno o más sitios de unión a antígeno descritos más abajo.

[0091] Las proteínas de unión de la divulgación se pueden preparar utilizando dominios o secuencias obtenidas o derivadas de cualquier anticuerpo humano o no humano, incluidos, por ejemplo, anticuerpos humanos, murinos o humanizados. 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.

Sitios de Unión Anti-CD38

[0092] Ciertos 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 (p. ej., polipéptidos CD38 humanos y de mono cinomolgo).

[0093] En algunas realizaciones, una proteína de unión o un fragmento de unión a antígeno de la misma reacciona de forma cruzada con CD38 humano (p. ej., un polipéptido de isoforma A y/o isoforma E de CD38 humano) y CD38 de mono cinomolgo. En algunas realizaciones, una proteína de unión induce la apoptosis de una célula CD38+. En algunas realizaciones, una proteína de unión recluta una célula T a una célula CD38+ y opcionalmente activa la célula T (p. ej., mediante estimulación y/o coestimulación de TCR).

[0094] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33); y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o 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, un sitio de

unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33); y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQG (SEQ ID NO:132), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o 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, las proteínas de unión comprenden 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR de una secuencia de dominio VH y/o VL de anticuerpo de antiCD38_C2-CD38-1, antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3, CD38^{HHY1370} (también puede ser referido en la presente memoria como antiCD38_1370), FALA IgG4 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid, P329A LALA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid, NNSA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid, FALA IgG4 CD38^{HHY1370}xCD28supxCD3mid, P329A LALA IgG1 CD38^{HHY1370}xCD28supxCD3mid, o NNSA IgG1 CD38^{HHY1370}xCD28supxCD3mid, como se muestra en la Tabla G, H, o I.

[0095] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31) o GYTFTSYA (SEQ ID NO:37), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32) o IYPGQGGT (SEQ ID NO:38), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34) o QSVSSYGQGF (SEQ ID NO:39), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35) o GAS (SEQ ID NO:40), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36).

[0096] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33); y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36).

En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSFN (SEQ ID NO:31), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNGGT (SEQ ID NO:32), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARTGGLRRAYFTY (SEQ ID NO:33); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVDSYGNGF (SEQ ID NO:34), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de LAS (SEQ ID NO:35), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQNKEDPWT (SEQ ID NO:36).

In otras realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo 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/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo 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).

En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo 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 un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo 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).

[0097] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKAS (SEQ ID NO:86), QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSKAS (SEQ ID NO:87), o QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKAS (SEQ ID NO:88); donde FR2 comprende la secuencia MHWVKEAPGQRLEWIGY (SEQ ID NO:90) o MHWVKEAPGQGLEWIGY (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 WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:96). En algunas realizaciones, el dominio VL comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRAS (SEQ ID NO:97); donde FR2 comprende la secuencia MHWYQQKPGQPRLIY (SEQ ID NO:99); donde FR3 comprende la secuencia SRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC (SEQ ID NO:101); y donde FR4 comprende la secuencia FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:103).

[0098] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos

99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

[0100] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, 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.

[0101] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y/o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16.

[0102] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación

comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación 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.

[0103] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYG (SEQ ID NO:41), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWYDGSNK (SEQ ID NO:42), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43); y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QGIRND (SEQ ID NO:44), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:45), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46). En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD38 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFSSYG (SEQ ID NO:41), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWYDGSNK (SEQ ID NO:42), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARMFRGAFDY (SEQ ID NO:43); y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QGIRND (SEQ ID NO:44), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:45), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de LQDYIYYPT (SEQ ID NO:46).

[0104] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-H1—FR2—CDR-H2—FR3—CDR-H3—FR4;

donde FR1 comprende la secuencia QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS (SEQ ID NO:89); donde FR2 comprende la secuencia MHWVRQAPGKGLEWVAV (SEQ ID NO:92); donde FR3 comprende la secuencia YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO:95); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:96). En algunas realizaciones, el dominio VL comprende la secuencia, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, FR1—CDR-L1—FR2—CDR-L2—FR3—CDR-L3—FR4; donde FR1 comprende la secuencia AIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRAS (SEQ ID NO:98); donde FR2 comprende la secuencia GWYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:100); donde FR3 comprende la secuencia SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYC (SEQ ID NO:102); y donde FR4 comprende la secuencia WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:104).

[0105] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

[0106] En algunas realizaciones, el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; y el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9; y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

[0107] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 o una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:12. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

Sitios de Unión Anti-CD28

[0108] Ciertos 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 CD28 (p. ej., un polipéptido CD28 humano).

[0109] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une a CD28 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSY (SEQ ID NO:108), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNVNT (SEQ ID NO:109), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TRSHYGLDWNFDV (SEQ ID NO:110) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNIYVW (SEQ ID NO:111), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KAS (SEQ ID NO:112), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGQTPY (SEQ ID NO:113). En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD28 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GYTFTSY (SEQ ID NO:108), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IYPGNVNT (SEQ ID NO:109), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de TRSHYGLDWNFDV (SEQ ID NO:110) y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QNIYVW (SEQ ID NO:111), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KAS (SEQ ID NO:112), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQGQTPY (SEQ ID NO:113).

[0110] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD28 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLSDYG (SEQ ID NO:114), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWAGGGT (SEQ ID NO:115), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de

ARDKGYSYYYSMDY (SEQ ID NO:116) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVEYYVTSL (SEQ ID NO:117), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:118), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSRKVPYT (SEQ ID NO:119). En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD28 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFSLSDYG (SEQ ID NO:114), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IWAGGGT (SEQ ID NO:115), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de ARDKGYSYYYSMDY (SEQ ID NO:116) y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de ESVEYYVTSL (SEQ ID NO:117), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de AAS (SEQ ID NO:118), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQSRKVPYT (SEQ ID NO:119).

Sitios de Unión Anti-CD3

[0111] Ciertos 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 CD3 (p. ej., un polipéptido CD3 humano).

[0112] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD3 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFTKAW (SEQ ID NO:120), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IKDKSNSYAT (SEQ ID NO:121), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RGVYYALSPFDY (SEQ ID NO:122) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHNNANTY (SEQ ID NO:123), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEQ ID NO:124), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GQGTQYPFT (SEQ ID NO:125). En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD3 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFTKAW (SEQ ID NO:120), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IKDKSNSYAT (SEQ ID

NO:121), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de RGVYYALSPFDY (SEQ ID NO:122) y un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHNNANTY (SEQ ID NO:123), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEQ ID NO:124), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GQGTQYPFT (SEQ ID NO:125).

[0113] En algunas realizaciones, un sitio de unión que se une CD3 comprende: un dominio variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GFTFTKAW (SEQ ID NO:126), una secuencia de CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de IKDKSNSYAT (SEQ ID NO:127), y una secuencia de CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GVVYYALSPFDY (SEQ ID NO:128) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo que comprende una secuencia de CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHNNGNTY (SEQ ID NO:129), una secuencia de CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEQ ID NO:130), y una secuencia de CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de GQGTQYPFT (SEQ ID NO:131).

[0114] En algunas realizaciones de cualquiera de las proteínas de unión triespecíficas de la presente divulgación, un dominio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD3 (p. ej., CD3 humano) y un dominio de unión a antígeno se une a un polipéptido CD28 (p. ej., CD28 humano). En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende tres CDR de SEQ ID NO:49 o 51 como se muestra en la Tabla H, y el dominio VL1 comprende tres CDR de SEQ ID NO:50 o 52 como se muestra en la Tabla H. En algunas realizaciones, el dominio VH2 comprende tres CDR de SEQ ID NO:49 o 51 como se muestra en la Tabla H, y el dominio VL2 comprende tres CDR de SEQ ID NO:50 o 52 como se muestra en la Tabla H. En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende tres CDR de SEQ ID NO:53 o 84 como se muestra en la Tabla H, y el dominio VL1 comprende tres CDR de SEQ ID NO:54 o 85 como se muestra en la Tabla H. En algunas realizaciones, el dominio VH2 comprende tres CDR de SEQ ID NO:53 o 84 como se muestra en la Tabla H, y el dominio VL2 comprende tres CDR de SEQ ID NO:54 o 85 como se muestra en la Tabla H.

[0115] En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49, el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En algunas realizaciones, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49, el

dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En algunas realizaciones, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51, el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:52, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, y el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54.

[0116] En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49, el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y el dominio VL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el dominio V_{H1} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:49, el dominio VL1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:50, el dominio VH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, el dominio VL2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, el dominio V_{H3} comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, y el dominio VL3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.

[0117] En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende

una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, y la cuarta cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y la cuarta cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, y la cuarta cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y la cuarta cadena polipeptídica comprende una secuencia de polipéptido que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69.

[0118] En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:63. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:60, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:64, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69. En ciertas realizaciones, la primera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, la segunda cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, la tercera cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:71, y la cuarta cadena polipeptídica comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69.

[0119] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias de CDR de una secuencia de anticuerpo que se muestra en la Tabla G. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias de CDR, una secuencia de dominio VH, y/o una secuencia de dominio VL de una secuencia de anticuerpo que se muestra en la Tabla H. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 secuencias de CDR, una secuencia de dominio VH, y/o una secuencia de dominio VL de una secuencia de anticuerpo que se muestra en la Tabla I. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende 1, 2, 3, o 4 secuencias de polipéptidos que se muestran en la Tabla I.

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

Ab	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_L1	CDR_L2	CDR_L3
antiCD38 _C2- CD38-1	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)
antiCD38 _C2- CD38- 1_VH1- VL1	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)
antiCD38 _C2- CD38- 1_VH3- VL3	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)
antiCD38 _C2- CD38- 1_VH5- VL3	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)
antiCD38 _C2- CD38- 1_VH6- VL3	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)
CD38 _{HHY} 1370	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 de dominio variable de anti-CD38 y otras proteínas de unión.

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
antiCD3 8_C2- CD38-1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKA <u>SGYTFTSFN</u> MHWVKETPGQGLEWI GY <u>IYPGNNGGT</u> NYNQKFQKATLT ADTSSSTAYMQISSLTSEDSAVYFC <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO:5)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR A <u>ESVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPKLLIY <u>LASN</u> LESGVPAFSG SGSRTDFTLTIDPVEADDAATYY <u>CQONKEDPWT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:6)
antiCD3 8_C2- CD38- 1_VH1- VL1	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKA <u>SGYTFTSYA</u> MHWVKEAPGQRLEW IGY <u>IYPGQGGT</u> NYNQKFQGRATLT ADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFC <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WGQGTLLTVS S (SEQ ID NO:13)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR AS <u>QSVSSYGO</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>GASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPPEPE DFAVYYC <u>CQONKEDPWT</u> FGGGT KLEIK (SEQ ID NO:14)
antiCD3 8_C2- CD38- 1_VH3- VL3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKA <u>SGYTFTSFN</u> MHWVKEAPGQRLEWI GY <u>IYPGNNGGT</u> NYNQKFQGRATLTA DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYFCA <u>RTGGLRRAYFTY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:17)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR A <u>ESVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPPEPE DFAVYYC <u>CQONKEDPWT</u> FGGGT KLEIK (SEQ ID NO:18)
antiCD3 8_C2- CD38- 1_VH5- VL3	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKA <u>SGYTFTSFN</u> MHWVKEAPGQGLEWI GY <u>IYPGNNGGT</u> NYNQKFQGRATLTA DTSASTAYMEISSLRSEDTAVYFCA <u>RTGGLRRAYFTY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:21)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR A <u>ESVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPPEPE DFAVYYC <u>CQONKEDPWT</u> FGGGT KLEIK (SEQ ID NO:18)
antiCD3 8_C2- CD38- 1_VH6- VL3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCK A <u>SGYTFTSFN</u> MHWVKEAPGQRLE WIGY <u>IYPGNNGGT</u> NYNQKFQGRATL TADTSASTAYMEISSLRSEDTAVYF C <u>ARTGGLRRAYFTY</u> WGQGTLLTV SS (SEQ ID NO:23)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCR A <u>ESVDSYGN</u> GFMHWYQQKPG QPPRLLIY <u>LASS</u> RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPPEPE DFAVYYC <u>CQONKEDPWT</u> FGGGT KLEIK (SEQ ID NO:18)
CD38 ^{HHY} 1370	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAA <u>SGFTFSSYGM</u> MHWVRQAPGKGLEW VAVI <u>WYDGSNK</u> YYADSVKGRFTIS GDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY C <u>ARMFRGAFDY</u> WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:9)	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RAS <u>QGIRNDL</u> GWYQQKPGKAP KLLIY <u>AASS</u> LQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISGLQPEDSATYYC <u>LQ</u> <u>DYIYYPT</u> FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:10)
antiCD3 8_SB19	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKA SGYTFTDYWMQWVKQRPQGLEW IGTIYPGDGDTGYAQKFQKATLTA DKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYC ARGDYYGSNSLDYWGQGTSTTVSS (SEQ ID NO:47)	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITC KASQDVSTVVAWYQQKPGQSP RRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGA GTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ HYSPPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:48)
Anti- CD28 ^{sup}	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKA <u>SGYTFTSYIH</u> HWVRQAPGQGLEWI GSI <u>YPGNVNT</u> NYAQKFQGRATLTV DTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCT <u>RSHYGLDWNFDV</u> WGKGTTTVTVSS	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC QAS <u>QNIYVWL</u> NWYQQKPGKAP KLLIY <u>KASN</u> LHTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDATYYC <u>QQ</u> <u>GOTYPYT</u> FGQGTKLEIK (SEQ

Ab	VH (proteína)	VL (proteína)
	(SEQ ID NO:49)	ID NO:50)
Anti-CD28 _{cvn}	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVS <u>GFSLS</u>DYGVHWVRQPPGKGLEWL <u>GVIWAGGGT</u>NYNPSLKSRTISKD TSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA <u>RDKGYSYYY</u>SMDYWGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:51)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCR ASE <u>SV</u>EYYVTSL MQWYQQKPG QPPKLLIFA <u>AAS</u> NVESGVPARFSG SGSGTDFTLTINPVEANDVANY <u>CQ</u>SRKVPYTF GGQGTKLEIK (SEQ ID NO:52)
Anti-CD3 _{mid}	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA <u>SGFTFT</u>KAWMHWVRQAPGKQLE WVAQ <u>IKDKSNSYAT</u> YYADSVKGR FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYC <u>RGVYYALSPFDY</u> WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:53)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SS <u>QSLVHNNANTY</u> LSWYLQKP GQSPQSLIY <u>KVS</u> NRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC <u>GQGTQYPFT</u> FGSGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
Anti-CD3 _{low}	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA <u>SGFTFT</u>KAWMHWVRQAPGKQLE WVAQ <u>IKDKSNSYAT</u> YYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYC <u>RGVYYALSPFDY</u> WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO:84)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCK SS <u>QSLVHNNGNTY</u> LSWYLQKP GQSPQLLIY <u>KVS</u> NRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC <u>GQGTQYPFT</u> FGGGTKVEIK (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.

antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
Cadena Pesada 1 FALA IgG4(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSYGLDWNFDVWGKGTTVT VSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPDSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLG	SEQ ID NO: 60
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVH NNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGQPKAAPDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQNIYVW LNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQGQT YPYTFGQGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	SEQ ID NO: 61
Cadena Pesada 2 FALA IgG4(botón) antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP	SEQ ID NO: 62

presente divulgación)	SNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEM TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Cadena Ligera 2 antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1 (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSY GQGFMHWYQQKPGQPPRLLIYGASSRATGI PARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYCQ QNKEDPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	SEQ ID NO: 63
P329A LALA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 P329A LALA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSTAYMELSLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTVT VSSSQVLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPRE PQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	SEQ ID NO: 64
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., una primera cadena	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 61

de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)		
Cadena Pesada 2 P329A LALA IgG1(botón) antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	SEQ ID NO: 65
Cadena Ligera 2 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 63
NNSA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 NNSA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTN YAQKFQGRATLTVDTSTAYMELSRLRSD DTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGKGTTVT VSSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDK SNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWG QGTLVTVSSRTASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP	SEQ ID NO: 66

	PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNNASRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG	
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 61
Cadena Pesada 2 NNSA IgG1(botón) antiCD38_C2- CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NNASRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	SEQ ID NO: 67
Cadena Ligera 2CD38VH1 (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 63
FALA IgG4 CD38_{HHY1370}xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 FALA IgG4(ojal)	Véase más arriba.	SEQ ID

CD28supxCD3mid (p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)		NO: 60
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 61
Cadena Pesada 2 FALA CD38_{HHY1370} IgG4(botón) (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG	SEQ ID NO: 68
Ligera2 CD38_{HHY1370} (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRN DLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQDY IYYPTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C	SEQ ID NO: 69
P329A LALA IgG1 CD38_{HHY1370} xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 P329A LALA IgG1(ojal)	Véase más arriba.	SEQ ID

CD28supxCD3mid (p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)		NO: 64
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 61
Cadena Pesada 2 P329A LALA IgG1(botón) CD38_{HHY1370} (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 70
Ligera 2 CD38_{HHY1370} (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 69
NNSA IgG1 CD38_{HHY1370}xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 NNSA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 66

(p. ej., una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)		
Cadena Ligera 1 CD28^{sup}xCD3^{mid} (p. ej., una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 61
Cadena Pesada 2 NNSA IgG1(botón) CD38^{HHY1370} (p. ej., una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGT ^L TVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVT ^S WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSV ^T VPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN NASRVVSVLT ^V LHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYK ^T TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	SEQ ID NO: 71
Ligera 2 CD38^{HHY1370} (p. ej., una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO: 69
anticuerpo monovalente antiCD38_C2-CD38-1		
cadena pesada antiCD38_C2-CD38-1	QVQLQQSGAELVRSGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKETPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFKGKATLTADTSSSTAYMQISLTS EDSAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGT ^L VT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL	SEQ ID NO: 7

	VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	
cadena ligera antiCD38_C2- CD38-1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YGNQFMHWYQQKPGQPPLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATY YCQQNKEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 8
anticuerpo monovalente antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1		
cadena pesada antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSYAMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGQGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTSLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 15
cadena ligera antiCD38_C2- CD38-1_VH1-VL1	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSY GQGFMHWYQQKPGQPRLLIYGASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS	SEQ ID NO: 16

	TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	
anticuerpo monovalente antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3		
cadena pesada antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMELSSLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 19
cadena ligera antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSY GNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticuerpo monovalente antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3		
cadena pesada antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3	QVQLVQSGAEVVKSGASVKVSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQGLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISSLR EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ	SEQ ID NO: 22

	PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	
cadena ligera antiCD38_C2- CD38-1_VH5-VL3	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSY GNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticuerpo monovalente antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3		
cadena pesada antiCD38_C2-CD38-1_VH6- VL3	QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTF TSFNMHWVKEAPGQRLEWIGYIYPGNGGT NYNQKFQGRATLTADTSASTAYMEISLRS EDTAVYFCARTGGLRRAYFTYWGQGTLV VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLA GPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G	SEQ ID NO: 24
cadena ligera antiCD38_C2- CD38-1_VH6-VL3	DIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASESVDSY GNGFMHWYQQKPGQPPRLLIYLASSRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISPLEDFAVYYC QQNKEDPWTFGGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	SEQ ID NO: 20
anticuerpo monovalente CD38_{HHY1370}		
cadena pesada CD38_{HHY1370}	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISGDNSKNTLYLQMNSLRA	SEQ ID NO: 11

	EDTAVYYCARMFRGAFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLAGP DVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
cadena ligera CD38_{HHY1370}	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRN DLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDSATYYCLQD YIYYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	SEQ ID NO: 12
anticuerpo monovalente antiCD38_SB19		
cadena pesada antiCD38_SB19	QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFT DYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDT GYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSSLA SEDSAVYYCARGDY YGSNSLDYWGQGTSTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK	SEQ ID NO: 107
cadena ligera antiCD38_SB19	DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVST VVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDR FTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YSPPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	SEQ ID NO: 106

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

antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid IgG4 FALA		
Cadena Pesada 1 FALA IgG4(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCTTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCGGTCCCCTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAATCTGGCGGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCTT GCAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAC TCTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACAC CTTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCC TGTAATCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCT ACACCTGTAACTGGACCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAA TCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTG CCCAGCCCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCT CCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGA	SEQ ID NO:72

	AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC AGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGT TCAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGA AAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCC CCGCGAGCCTCAAGTGTGTACCCTGCCCC CTAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGAGCTGTGCCGTGAAAGGCT TCTACCCAGCGACATTGCCGTGGAATGG GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC ACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCT GACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAA GGCAACGTGTTTACAGCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
Cadena Ligera 1 CD28^{sup}xCD3^{mid} (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	GACATCGTGATGACCCAGACCCCCCTGAG CCTGAGCGTGACACCTGGACAGCCTGCCA GCATCAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCT GGTGCACAACAACGCCAACACCTACCTG AGCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGA GCCCCAGTCCCTGATCTACAAGGTGTCC AACAGATTCAGCGGCGTGCCCGACAGATT CTCCGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCA CCCTGAAGATCAGCCGGGTGGAAGCCGA GGACGTGGGCGTGTACTATTGTGGCCAGG GCACCCAGTACCCCTTACCTTTGGCAGC GGCACCAAGGTGGAAATCAAGGGCCAGC CCAAGGCCGCCCCGACATCCAGATGACC CAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGT GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAG GCCAGCCAGAACATCTACGTGTGGCTGAA CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCC CCCAAGCTGCTGATCTACAAGGCCAGCAA CCTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGATTTT CTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC CTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGA CATTGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCC AGACCTACCCCTACACCTTTGGCCAGGGC	SEQ ID NO:73

	ACCAAGCTGGAAATCAAGACCAAGGGCC CCAGCCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCC AAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTG TACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGT	
Cadena Pesada 2 FALA IgG4(botón) antiCD38_C2- CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCCGGCCAGGGCGGCA CCAATAACAACCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCATCGGTGTTCCCTCTGGCCCCTTG CAGCAGAAGCACCCAGCGAATCTACAGCC GCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTT TCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGT CTGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGACACC TTTCCAGCCGTGCTCCAGAGCAGCGGCCT GTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTA CACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAT CTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGC CCAGCCCCTGAAGCTGCCGGCGGACCCTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAAGCCCAAGG ACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCA GGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC	SEQ ID NO:74

	CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTC AACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCC CGCGAGCCTCAAGTGTATAACCCTGCCCC TTGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAG GTGTCCCTGTGGTGTCTCGTGAAAGGCTT CTACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGG AGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCG ACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAG GCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCTCTGTCCCTGGGC	
Cadena Ligera 2 antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1 (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	GACATCGTGCTGACACAGAGCCCTGCCAC CCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCA CCATCAGCTGTAGAGCCAGCCAGAGCGT GTCCAGCTACGGCCAGGGCTTCATGCACT GGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCC CAGACTGCTGATCTATGGCGCCAGCAGCA GAGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTTTCT GGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCT GACAATCAGCCCCCTGGAACCCGAGGAC TTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGAACAA AGAGGACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGC ACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCACCT AGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAG CCTCTGTCTGTGCTGCTGAACAACCTC TACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGA AGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATTAC GAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAG TGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTG ACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC	SEQ ID NO:75
P329A LALA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid		

Cadena Pesada 1 P329A LALA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCGGTCCCCTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAATCTGGCGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG TCCCCCTTGTCTGCCCCCGAAGCCGCCG GAGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA	SEQ ID NO:76
---	---	--

	GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAG AGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCC CCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTGC ACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGG TGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACCCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGC	
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:73
Cadena Pesada 2 P329A LALA IgG1(botón) antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1 (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCTTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCA CCAATAACAACCAGAAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAG CAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCC GCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTT	SEQ ID NO:77

	TCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAATT CTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACC TTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGC CCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACC CAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCCCCTTGTCTGCCCCCGAAGCCGCCGG AGGCCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAA AGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGA GGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGGCCGCCCC CATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCCCGCGAACCCCAAGGTGTACA CACTGCCCCCATGCAGGGACGAGCTGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGT GAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCG TGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGA GAACA ACTACAAGACCACCCCCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTAC TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGG C	
Cadena Ligera 2 antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1 (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:75
NNSA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid		

Cadena Pesada 1 NNSA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA GGTCGTGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGG TGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACTACATCCACTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGACAGGGACTGGAATGGATC GGCAGCATCTACCCCGGCAACGTGAACA CCAACTACGCCCAGAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGTGGACACCAGCATCA GCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCCGGCTG AGAAGCGACGACACCGCCGTGTACTACT GCACCCGGTCCCCTACGGCCTGGATTGG AACTTCGACGTGTGGGGCAAGGGCACCA CCGTGACAGTGTCTAGCAGCCAGGTGCAG CTGGTGGAATCTGGCGGCGGAGTGGTGC AGCCTGGCAGAAGCCTGAGACTGAGCTG TGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCACCAAGG CCTGGATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCT GGAAAGCAGCTGGAATGGGTGGCCCAGA TCAAGGACAAGAGCAACAGCTACGCCAC CTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGG TTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TCGGGGCGTGTACTATGCCCTGAGCCCCT TCGATTACTGGGGCCAGGGAACCCTCGTG ACCGTGTCTAGTCGGACCGCCAGCACAAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTA GCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGC CGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAT TCTGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACAC CTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCC TGTACAGCCTGAGCAGCGTCGTGACAGTG CCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAAC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTG TCCCCCTTGTCTGCCCCCGAAGTGTGG GAGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCC GGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA	SEQ ID NO:78
---	--	--------------------------------

	GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAG AGGAACAGTACAACAATGCCTCCCGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCC CCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTGC ACACTGCCCCCAAGCAGGGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGTGCC GTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGC CGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCC GAGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGG TGTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTC CGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACCCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC GGC	
Cadena Ligera 1 CD28^{sup}xCD3^{mid} (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:73
Cadena Pesada 2 NNSA IgG1(botón) antiCD38_C2- CD38-1_VH1-VL1 (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGA AGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCTTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTT ACCAGCTACGCCATGCACTGGGTCAAAG AGGCCCCCTGGCCAGAGACTGGAATGGAT CGGCTACATCTACCCCGGCCAGGGCGGCA CCAATAACAACCAGAAAGTTCCAGGGCAG AGCCACCCTGACCGCCGATACAAGCGCC AGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCT GCGGAGCGAGGATACCGCCGTGTACTTCT GTGCCAGAACAGGCGGCCTGAGGCGGGC CTACTTTACCTATTGGGGCCAGGGCACCC TCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACAAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT	SEQ ID NO:79

	CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCC CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTATGTTGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAATGC CTCCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAAT CAAGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTAA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACTCAAACCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT	
Cadena Ligera 2 antiCD38_C2-CD38-1_VH1- VL1 (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:75
FALA IgG4 CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid}		

Cadena Pesada 1 FALA IgG4(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:72
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:73
Cadena Pesada FALA IgG4(botón) 2CD38^{HHY1370} (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCCATCG GTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCAGCAGAAG CACCAGCGAATCTACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCT GACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCG TGCTCCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTG AGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCA GCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAAC GTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGCGGGTGGAATCTAAGTACGG CCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTG AAGCTGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCTG TTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT	SEQ ID NO:80

	GATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC GTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCC CGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACG GCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACC TACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCC TGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTC AAGTGTATACCCTGCCCCCTTGCCAGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGT GGTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGC GACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCAC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCAT TCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGT TCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC TCTGTCCCTGGGC	
Ligera 2 CD38_{HHY1370} (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCA GCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGGCAT CCGGAACGACCTGGGCTGGTATCAGCAG AAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGAT CTACGCCGCTAGCTCTCTGCAGTCCGGCG TGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCC GGCACC GACTTCACCCTGACAATCTCTGG CCTGCAGCCCGAGGACAGCGCCACCTACT ACTGTCTGCAAGACTACATCTACTACCCC ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAA TCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTG TTCATCTTCCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACAGCCTCTGTCTGTGCC TGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCC AAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGCACTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTG TACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCT GTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC	SEQ ID NO:81

	GGGGCGAGTGT	
P329A LALA IgG1 CD38_{HHY1370}xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 P329A LALA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:76
Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:73
Cadena Pesada 2 P329A LALA IgG1(botón) CD38_{HHY1370} (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCCCAGC GTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAG CACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCT GCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCC GTGACCGTGTCTTGGGAATTCTGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTG TGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTACAGCCTG AGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTC TCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGC	SEQ ID NO:82

	GACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCC TGCCCCCGAAGCCGCCGGAGGCCCTTCCG TGTTCTGTTCACCCCAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACG AGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCAAGAGAGGAACAGTACAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGA CCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGCCCTGGCCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGC GAACCCCAAGGTGTACACACTGCCCCCATG CAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGTGGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTA CCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGA GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAA GACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACG GCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACA GTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTC CCTGAGCCTGAGCCCCGGC	
Ligera 2 CD38_{HHY1370} (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:81
NNSA IgG1 CD38_{HHY1370}xCD28supxCD3mid		
Cadena Pesada 1 NNSA IgG1(ojal) CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una segunda cadena de polipéptido de una proteína de unión triespecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:78

Cadena Ligera 1 CD28supxCD3mid (p. ej., que codifica una primera cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:73
Cadena Pesada 2 NNSA IgG1(botón) CD38^{HHY1370} (p. ej., que codifica una tercera cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	CAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAG GCGTGGTGCAGCCTGGCAGGTCTCTGAGA CTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT CAGCAGCTACGGAATGCACTGGGTGCGC CAGGCCCCCTGGCAAAGGACTGGAATGGG TGGCCGTGATTTGGTACGACGGCAGCAAC AAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCGGCGACAACAGCAA GAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCC TGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGAATGTTTCAGAGGCGCCTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCG TGTCTAGTGCGTCGACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCC AGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCCTTCAACCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA TGTTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAATGCCTCCCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC	SEQ ID NO:83

	ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGC CGGGATGAGCTGACCAAGAATCAAGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTAAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACTCAAACTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGT	
Ligera 2 CD38_{HHY1370} (p. ej., que codifica una cuarta cadena de polipéptido de una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación)	Véase más arriba.	SEQ ID NO:81

Polipéptidos CD38

[0120] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende un sitio de unión de antígeno que se une a un dominio extracelular de un polipéptido CD38 humano y un dominio extracelular de un polipéptido CD38 de mono cinomolgo. En la presente memoria se describen ensayos ilustrativos para determinar si un sitio de unión a antígeno se une a un antígeno y se conocen en la técnica. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante un ensayo ELISA, p. ej., como se describe más adelante. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante un ensayo de SPR, p. ej., como se describe más adelante. En algunas realizaciones, la unión se determina mediante un ensayo de citometría de flujo utilizando células que expresan un polipéptido CD38 sobre su superficie celular, p. ej., como se describe más adelante.

[0121] 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 (p. ej., medida por medio de ELISA o SPR). En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un

polipéptido o comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 30 cuando se expresa sobre la superficie de una célula (p. ej., medida por medio de citometría de flujo).

[0122] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación se une a un polipéptido de la isoforma A de CD38 (p. ej., 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 de la isoforma E de CD38 (p. ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y 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 de isoforma A de CD38 (p. ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y un polipéptido de isoforma E de CD38 (p. ej., que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 y 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 desear estar limitado a la teoría, se cree que la unión a un polipéptido de isoforma E de CD38 puede ser ventajosa, p. ej., para el direccionamiento de una proteína de unión de la presente divulgación a células que expresan un polipéptido de isoforma E de CD38.

Secuencia de polipéptido del dominio extracelular de isoforma A de CD38 humano

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCN
ITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDL
TWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSR
SKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNI
QFSCKNYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI (SEQ ID NO:1)

Secuencia de polipéptido de isoforma E de CD38 humano

RWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCN
ITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLYADDL
TWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRHFWECGSP (SEQ ID
NO:105)

[0123] 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 de CD38 de mono cinomolgo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

Secuencia de polipéptido CD38 de mono cinomolgo

RWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPC
NITEEDYQPLVKLGTVPCNKTLLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLAD
DLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNG
SRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKR
NIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI (SEQ ID NO:30)

Enlazadores

[0124] En algunas realizaciones, los enlazadores L₁, L₂, L₃ y L₄ varían desde ningún aminoácido (longitud = 0) hasta aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, o menos de 100, 50, 40, 30, 20 o 15 aminoácidos o menos. Los enlazadores también pueden tener una longitud de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos. L₁, L₂, L₃ y L₄ en una proteína de unión pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos o pueden tener todos diferentes secuencias de aminoácidos.

[0125] Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen un solo resto de glicina (Gly); un péptido de diglicina (Gly-Gly); un tripéptido (Gly-Gly-Gly); un péptido con cuatro restos de glicina; un péptido con cinco restos de glicina; un péptido con seis restos de glicina; un péptido con siete restos de glicina; y un péptido con ocho restos de glicina. Se pueden usar otras combinaciones de restos de aminoácidos tales como el péptido GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), el péptido GGGGSGGGSGGGGS (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). No se pretende que los ejemplos enumerados anteriormente limiten el alcance de la divulgación de ninguna manera, y se ha demostrado que los enlazadores que comprenden aminoácidos seleccionados al azar seleccionados del grupo que consiste en valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, lisina, arginina, histidina, aspartato, glutamato, asparragina, glutamina, glicina y prolina son adecuados en las proteínas de unión. Para obtener descripciones adicionales de las secuencias enlazadoras, véanse, p. ej., el documento WO2012135345 y la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2017/027488.

[0126] La identidad y secuencia de los restos de aminoácidos en el enlazador pueden variar dependiendo del tipo de elemento estructural secundario que sea necesario lograr en el

enlazador. Por ejemplo, la glicina, la serina y la alanina son mejores para enlazadores que tienen la máxima flexibilidad. Ciertas combinaciones de glicina, prolina, treonina y serina son útiles si se necesita un enlazador más rígido y extendido. Cualquier resto de aminoácido puede considerarse como un enlazador combinado con otros restos de aminoácidos para construir enlazadores peptídicos más grandes según sea necesario, dependiendo de las propiedades deseadas.

[0127] En algunas realizaciones, al menos uno de L_1 , L_2 , L_3 o L_4 tiene independientemente 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 o L_4 tienen cada uno independientemente al menos un aminoácido de longitud. En algunas realizaciones, la longitud de L_1 es al menos el doble de la longitud de L_3 . En algunas realizaciones, la longitud de L_2 es al menos el doble de 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 tiene al menos el doble de longitud que L_4 . En algunas realizaciones, L_1 tiene de 3 a 12 restos de aminoácidos de longitud, L_2 tiene de 3 a 14 restos de aminoácidos de longitud, L_3 tiene de 1 a 8 restos de aminoácidos de longitud y L_4 tiene de 1 a 3 restos de aminoácidos. en longitud. En algunas realizaciones, L_1 tiene de 5 a 10 restos de aminoácidos de longitud, L_2 tiene de 5 a 8 restos de aminoácidos de longitud, L_3 tiene de 1 a 5 restos de aminoácidos de longitud y L_4 tiene de 1 a 2 restos de aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 tiene una longitud de 7 restos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 5 restos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 1 resto de aminoácido y L_4 tiene una longitud de 2 restos de aminoácido. En algunas realizaciones, L_1 tiene una longitud de 10 restos de aminoácidos, L_2 tiene una longitud de 10 restos de aminoácidos, L_3 tiene una longitud de 0 restos de aminoácidos y L_4 tiene una longitud de 0 restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 tienen cada uno una longitud seleccionada independientemente de 0 a 15 aminoácidos (p. ej., 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 enlazadores tienen una longitud de 1 a 15 aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos). En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 tienen cada uno 0 aminoácidos de longitud.

[0128] En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y/o L_4 comprenden una secuencia derivada de una secuencia natural en la unión entre un dominio variable de anticuerpo y un dominio constante de anticuerpo (p. ej., como se describe en el documento WO2012/135345). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlazador comprende una secuencia que se encuentra en la transición entre un dominio V_H y C_H1 endógeno, o entre un dominio V_L y C_L endógeno (p. ej., kappa o lambda). En algunas realizaciones, el enlazador comprende una secuencia que se

encuentra en la transición entre un dominio V_H y C_{H1} humano endógeno, o entre un dominio V_L y C_L humano endógeno (p. ej., kappa o lambda humanos).

[0129] En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 tienen cada uno independientemente cero aminoácidos de longitud o comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59). En algunas realizaciones, L_1 , L_2 , L_3 y L_4 comprenden cada uno independientemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), S, RT, TKGPS (SEQ ID NO: 57), GQPKAAP (SEQ ID NO: 58) y GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59).

[0130] En algunas realizaciones, L_1 comprende la secuencia GQPKAAP (SEQ ID NO: 58), L_2 comprende la secuencia TKGPS (SEQ ID NO: 57), L_3 comprende la secuencia S y L_4 comprende la secuencia RT. En algunas realizaciones, L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_2 comprende la secuencia GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_2 comprende la secuencia GGSGSSGSGG (SEQ ID NO: 59), L_3 tiene 0 aminoácidos de longitud y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, L_1 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56), L_2 tiene 0 aminoácidos de longitud, L_3 comprende la secuencia GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56) y L_4 tiene 0 aminoácidos de longitud.

Regiones Fc y dominios constantes

[0131] 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, p. ej., una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas. En algunas realizaciones, la región Fc incluye una bisagra de anticuerpo, dominios 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 adelante.

[0132] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación incluye una o dos variantes de Fc. El término "variante de Fc", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo pero

que aún comprende un sitio de unión para el receptor salvaje, FcRn (receptor de Fc neonatal). Se conocen en la técnica variantes de Fc ilustrativas y su interacción con el receptor de rescate. Por tanto, el término "variante de Fc" puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para las proteínas de unión de tipo anticuerpo de la invención. Por tanto, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o restos de Fc nativos, o en la que uno o más sitios o restos de Fc han sido modificados, que afectan a, o están implicados en: (1) la formación de enlace disulfuro, (2) la incompatibilidad con una célula anfitriona seleccionada, (3) la heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula anfitriona seleccionada, (4) la glicosilación, (5) la interacción con el complemento, (6) la unión a un receptor de Fc distinto de un receptor salvaje, o (7) la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

[0133] 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 (p. ej., fagocitosis celular dependiente de anticuerpos mediada por receptor de Fc (ADCP), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)).

[0134] En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y/o 329 de IgG1 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y/o P329A. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299 y/o 300 de IgG1 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A y/o Y300S.

[0135] 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 de Fc γ I y/o Fc γ II. 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 de Fc γ I y/o Fc γ II pero que no afectan a la unión de FcRn. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y/o 409 de IgG4 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son S228P y/o R409K. En algunas realizaciones, la región Fc es una región

Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y/o 235 de IgG4 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son F234A y/o L235A. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235 y/o 409 de IgG4 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A y/o R409K. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A y una delección en 236. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende mutaciones de aminoácidos en las sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236, y/o 409 de IgG4 humana según el Índice de la UE. En algunas realizaciones, las mutaciones de aminoácidos son S228P; E233P, F234V, L235A, y una delección en 236; y/o R409K.

[0136] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, p. ej., modulando la afinidad por un reactivo de purificación. Por ejemplo, se sabe que las proteínas de unión heterodiméricas se pueden purificar selectivamente de sus formas homodiméricas si una de las dos regiones Fc de la forma heterodimérica contiene una o varias mutaciones que reducen o eliminan la unión a la proteína A, ya que la forma heterodimérica tendrá una afinidad intermedia para la purificación basada en proteína A en comparación con cualquier forma homodimérica y se puede hacer eluir selectivamente de la proteína A, p. ej., mediante el uso de un pH diferente (véase, p. ej., 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 humanas según el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R e Y436F. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH1, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH2 y CH3, y una tercera cadena polipeptídica adicional que comprende una segunda región Fc conectada a CH1, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada CH2 y CH3 de inmunoglobulina; y en donde solo una de la primera y segunda regiones Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones

correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humana según el índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R e Y436F. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botones en ojales y una o más mutaciones para mejorar la purificación. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0137] En algunas realizaciones, una o ambas regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 233-236 de IgG4 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son E233P, F234V, L235A y una delección en 236. En algunas realizaciones, las regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana que comprenden mutaciones de aminoácidos en sustituciones correspondientes a las posiciones 228, 233-236 y/o 409 de IgG4 humana según el Índice UE. En algunas realizaciones, las mutaciones de aminoácidos son S228P; E233P, F234V, L235A y una delección en 236; y/o R409K. En algunas realizaciones, una o ambas regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y/o 329 de IgG1 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y/o P329A. En algunas realizaciones, las regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana que comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 298, 299 y/o 300 de IgG1 humana según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son S298N, T299A y/o Y300S.

[0138] Para mejorar los rendimientos de algunas proteínas de unión (p. ej., proteínas de unión biespecíficas o triespecíficas), los dominios CH_3 se pueden alterar mediante la tecnología "botón en ojal" que se describe en detalle con varios ejemplos, por ejemplo, en la Publicación Internacional. Núm. 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 CH_3 se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios CH_3 . Cada uno de los dos dominios CH_3 (de las dos cadenas pesadas) puede ser el "botón", mientras que el otro es el "ojal". La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente 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 el segundo par de polipéptidos con un único dominio variable. En otras realizaciones, el botón está en el primer par de polipéptidos que

tienen la orientación cruzada. En otras realizaciones más, los dominios CH₃ no incluyen un botón en ojal.

[0139] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación (p. ej., una proteína de unión inespecífica) comprende una mutación de "botón" en la segunda cadena polipeptídica y una mutación "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 "ojal" en la segunda cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, la mutación de "botón" comprende una o varias sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y/o 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos 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 humanas según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas realizaciones, la mutación de "ojal" comprende una o varias sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 407 y, opcionalmente, 349, 366 y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice UE. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos 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 humanas según el Índice EU. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A e Y407V.

[0140] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH₁, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃, en donde la primera región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 366 y opcionalmente 354 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son T366W o T366Y y opcionalmente S354C; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH₁, la segunda región Fc comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃, en donde la segunda región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 407 y opcionalmente 349, 366 y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humana según el Índice UE, en donde

las sustituciones de aminoácidos son Y407V o Y407T y opcionalmente Y349C, T366S, y/o L368A.

[0141] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la primera región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 407 y opcionalmente 349, 366 y/o 368 y de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y407V o Y407T y opcionalmente Y349C, T366S y/o L368A; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la segunda región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 366 y opcionalmente 354 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son T366W o T366Y y opcionalmente S354C.

[0142] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la primera región Fc comprende sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente a posición 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde la sustitución de aminoácidos es T366W; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la segunda región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 366, 368 y/o 407 de IgG1 o IgG4 humanas de acuerdo con el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son T366S, L368A, y/o Y407V.

[0143] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la primera región Fc comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 366, 368 y/o 407 y de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de

aminoácidos son T366S, L368A y/o Y407V; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la segunda región Fc comprende la sustitución de aminoácidos en la posición correspondiente a la posición 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice UE, en donde la sustitución de aminoácido es T366W.

[0144] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 349, 366, 368 y 407 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice UE, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A e Y407V. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a posiciones 349, 366, 368 y 407 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son Y349C, T366S, L368A e Y407V; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 354 y 366 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S354C y T366W. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0145] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , en donde la primera región Fc es una

región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 354, 366 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, S354C, T366W y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 349, 366, 368, 407 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V y R409K. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc unida a CH_1 , en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 349, 366, 368, 407 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, Y349C, T366S, L368A, Y407V y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc unida a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 354, 366, y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, S354C, T366W, y R409K.

[0146] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235, 354 y 366 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, S354C y T366W; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región

bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235, 349, 366, 368 y 407 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A e Y407V. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235, 349, 366, 368 y 407 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A e Y407V; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235, 354, y 366 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A, L235A, S354C, y T366W.

[0147] En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235, 354, 366 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, S354C, T366W y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V y R409K. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , en donde la primera región Fc es una región Fc de IgG4

humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235, 349, 366, 368, 407 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, Y349C, T366S, L368A, Y407V y R409K; y en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , en donde la segunda región Fc es una región Fc de IgG4 humana que comprende una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la segunda región Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228, 234, 235, 354, 366, y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P, F234A, L235A, S354C, T366W, y R409K.

[0148] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (véase, p. ej., 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 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera y/o segunda regiones Fc comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU en donde las sustituciones de aminoácidos 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 la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0149] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la estabilidad, p. ej., de la región bisagra y/o la interfaz del dímero de IgG4 (véase, p. ej., 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 según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc unida a CH₁, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃, y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH₁, comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃; en donde la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana; y en donde la primera y la segunda regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 228 y 409 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son S228P y R409K. En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende mutaciones de botón en ojal y una o más mutaciones para mejorar la estabilidad. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0150] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la purificación, p. ej., modulando 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 varias mutaciones que reducen o eliminan la unión a la Proteína A, ya que la forma heterodimérica tendrá una afinidad intermedia por la purificación basada en la Proteína A en comparación con cualquier forma homodimérica y se puede hacer eluir selectivamente de la Proteína A, p. ej., mediante el uso de un pH diferente (véase, p. ej., 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 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R e Y436F. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH₁, comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃, y una tercera cadena polipeptídica adicional que comprende una segunda región Fc conectada a CH₁, comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃; y en donde solo una de

la primera y segunda regiones Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 435 y 436 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son H435R e 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 la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0151] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero (véase, p. ej., 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 humanas según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son M428L y N434S. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a CH_1 , comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 , en donde la primera y/o segunda regiones Fc comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 428 y 434 de IgG1 o IgG4 humanas según el Índice EU en donde las sustituciones de aminoácidos 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 la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda región Fc son regiones Fc de IgG4 humana.

[0152] En algunas realizaciones, una proteína de unión de la presente divulgación comprende una o más mutaciones para reducir la función efectora, p. ej., fagocitosis celular dependiente de anticuerpos mediada por receptor de Fc (ADCP), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a CH_1 , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH_2 y CH_3 ; en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc

conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} ; en donde la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana; y en donde la primera y la segunda regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de la IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A y L235A. En algunas realizaciones, la segunda cadena polipeptídica comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} ; en donde la tercera cadena polipeptídica comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región de bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} ; en donde la primera y segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana; y en donde la primera y segunda regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son regiones Fc de IgG1 humana, y en donde las regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234, 235 y 329 de IgG1 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son L234A, L235A y P329A. En algunas realizaciones, las regiones Fc de la segunda y tercera cadenas polipeptídicas son regiones Fc de IgG4 humana, y las regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A. En algunas realizaciones, la proteína de unión comprende una segunda cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una primera región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la primera región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios constantes de cadena pesada de inmunoglobulina C_{H2} y C_{H3} , y una tercera cadena polipeptídica que comprende adicionalmente una segunda región Fc conectada a C_{H1} , comprendiendo la segunda región Fc una región bisagra de inmunoglobulina y dominios

constantes de cadena pesada de inmunoglobulina CH₂ y CH₃; y en donde la primera y la segunda regiones Fc comprenden cada una sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 234 y 235 de IgG4 humana según el Índice EU, en donde las sustituciones de aminoácidos son F234A y L235A.

[0153] 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 la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG1 humana. En algunas realizaciones, la primera y/o la segunda regiones Fc son regiones Fc de IgG4 humana. Para una descripción más detallada de las mutaciones de Fc en la posición 329, véanse, p. ej., Shields, R.L. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 y el documento WO1999051642.

[0154] En algunas realizaciones, los tipos de mutaciones descritos más arriba se pueden combinar 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", las una o más mutaciones para mejorar la semivida en suero, las una o más mutaciones para mejorar la estabilidad de IgG4, las una o más mutaciones para mejorar la purificación, y/o las una o más mutaciones para reducir la función efectora descritas más arriba.

Ácidos nucleicos

[0155] Se utilizan metodologías convencionales de ADN recombinante para construir los polinucleótidos que codifican los polipéptidos que forman las proteínas de unión, incorporar estos polinucleótidos a vectores de expresión recombinantes e introducir tales vectores en las células anfitrionas. Véase, p. ej., Sambrook et al., 2001, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed.). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica, o como se describe en la presente memoria. A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritos en la presente memoria es la bien conocida y comúnmente utilizada en la técnica. De manera similar, se pueden usar técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, suministro y tratamiento de pacientes.

[0156] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de

las proteínas de unión descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico aisladas comprenden una secuencia que es al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idéntica a SEQ ID NO: 60-83 y/o se muestran en la Tabla J.

[0157] Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a kits de polinucleótidos. En algunas realizaciones, uno o más de los polinucleótidos es un vector (p. ej., un vector de expresión). Los kits pueden encontrar uso, entre otras cosas, en la producción de una o más de las proteínas de unión descritas en la presente memoria, p. ej., una proteína de unión trispecífica de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el kit comprende uno, dos, tres o cuatro polinucleótidos que se muestran en la Tabla J (p. ej., de FALA IgG4 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3mid, NNSA IgG1 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1xCD28supxCD3 P32_CHLAL-CDA-VL1xCD28supxCD3mid, FALA IgG4 CD38_{HHY1370} xCD28supxCD3mid, P329A LALA IgG1 CD38_{HHY1370} xCD28supxCD3mid o NNSA IgG1 CD38_{HHY1370}CD28supxCD3mid). En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 74, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 79, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 75. En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 80, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81. En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende: un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 76, un tercer

polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81. En algunas realizaciones, un kit de polinucleótidos comprende un primer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, un segundo polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, un tercer polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 83, y un cuarto polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81.

[0158] En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado está conectado operablemente 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 conectada operablemente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está conectado operablemente a una secuencia codificante de una proteína de unión si el promotor afecta a la transcripción o a la expresión de la secuencia codificante. Los ejemplos de promotores pueden incluir, pero no se limitan a, promotores obtenidos de los genomas de virus (tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B, el virus de Simios 40 (SV40) y similares), de promotores eucarióticos heterólogos (tales como el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico y similares), el promotor CAG (Niwa et al., Gene 108 (2):193-9, 1991), el promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK), un promotor inducible por tetraciclina (Masui et al., Nucleic Acids Res. 33:e43, 2005), el sistema lac, el sistema trp, el sistema tac, el sistema trc, el operador principal y las regiones promotoras del fago lambda, el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura y el promotor de los factores de apareamiento de levadura alfa. 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 la presente memoria u otro promotor adecuado que sea fácilmente reconocido por un experto en la técnica.

[0159] En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado se incorpora a un vector. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión. Los vectores de expresión pueden incluir una o más secuencias reguladoras conectadas operablemente al polinucleótido que se va a expresar. El término "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Los ejemplos de

potenciadores adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (tales como globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, insulina y similares) y secuencias potenciadoras de un virus de células eucarióticas (tales como el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, potenciadores de adenovirus y similares). Los ejemplos de vectores adecuados pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, episomas, transposones y vectores virales (p. ej., vectores adenovirales, virales de vaccinia, virales Sindbis, del sarampión, virales de herpes, lentivirales, retrovirales, virales adenoasociados, etc.). Se pueden usar vectores de expresión para transfectar células anfitrionas, tales como, por ejemplo, células bacterianas, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos. Los vectores de ADN plasmídico y viral biológicamente funcionales susceptibles de expresión y replicación en un anfitrión son conocidos en la técnica y se pueden utilizar para transfectar cualquier célula de interés.

[0160] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a un sistema de vectores que comprende uno o más vectores que codifican una primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sistema de vectores comprende un primer vector que codifica la primera cadena polipeptídica de la proteína de unión, un segundo vector que codifica la segunda cadena de polipéptidos de la proteína de unión, un tercer vector que codifica la tercera cadena de polipéptidos 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 vectores 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 vectores 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 vectores 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 vectores comprende un primer vector que codifica la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas de la proteína de unión. Los uno o más vectores del sistema de vectores puede

ser cualquiera de los vectores descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los uno o más vectores son vectores de expresión.

Células anfitrionas aisladas

[0161] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a una célula anfitriona aislada que comprende uno o más polinucleótidos aislados, kits de polinucleótidos, vectores y/o sistemas de vectores descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula bacteriana (p. ej., una célula de *E. coli*). En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula de levadura (p. ej., una célula de *S. cerevisiae*). En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula de insecto. Los ejemplos de células anfitrionas de insectos pueden incluir, por ejemplo, células de *Drosophila* (p. ej., células S2), células de *Trichoplusia ni* (p. ej., células High Five™) y células de *Spodoptera frugiperda* (p. ej., células Sf21 o Sf9). En algunas realizaciones, la célula anfitriona es una célula de mamífero. Los ejemplos de células anfitrionas de mamífero pueden incluir, por ejemplo, células de riñón embrionario humano (p. ej., células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión), células Expi293™, células CHO, células de riñón de cría de hámster (p. ej., BHK, ATCC CCL 10), células de sertoli de ratón (p. ej., células TM4), células de riñón de mono (p. ej., CV1 ATCC CCL 70), células de riñón de mono verde africano (p. ej., VERO-76, ATCC CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (p. ej., HELA, ATCC CCL 2), células renales caninas (p. ej., MDCK, ATCC CCL 34), células hepáticas de rata búfalo (p. ej., BRL 3A, ATCC CRL 1442), células pulmonares humanas (p. ej., W138, ATCC CCL 75), células hepáticas humanas (p. ej., Hep G2, HB 8065), células tumorales mamarias de ratón (p. ej., MMT 060562, ATCC CCL51), células TRI, células MRC 5, células FS4, una línea de hepatoma humano (p. ej., Hep G2), y células de mieloma (p. ej., células NS0 y Sp2/0).

Métodos y Usos para proteínas de unión

[0162] Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para expandir células T de memoria específicas de virus. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula T de memoria específica de virus con una proteína de unión de la presente divulgación, p. ej., una proteína de unión triespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 y un tercer sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido CD38.

[0163] En algunas realizaciones, la célula T de memoria específica de virus se pone en contacto con la proteína de unión *in vitro* o *ex vivo*.

[0164] En algunas realizaciones, el contacto de la célula T de memoria específica de virus con la proteína de unión ocasiona la activación y/o proliferación de las células T de memoria específicas de virus.

[0165] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para expandir células T. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula T con una proteína de unión de la presente divulgación, p. ej., una proteína de unión triespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3, y un tercer sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido CD38.

[0166] En algunas realizaciones, la célula T es una célula T de memoria o una célula efectora.

[0167] En algunas realizaciones, la célula T expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) sobre su superficie celular o comprende un polinucleótido que codifica un CAR.

[0168] Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para tratar una infección viral crónica, p. ej., en un individuo que lo necesite. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de una proteína de unión de la presente divulgación, p. ej., una proteína de unión inespecífica que comprende un primer sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD28, un segundo sitio de unión a antígeno que se une a un polipéptido CD3 y un tercer sitio de unión al antígeno que se une a un polipéptido CD38.

[0169] En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

[0170] En algunas realizaciones, la proteína de unión se administra al individuo en una formulación farmacéutica que comprende la proteína de unión y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0171] En algunas realizaciones, la administración de la proteína de unión da como resultado la activación y/o proliferación de células T de memoria específicas de virus en el individuo.

[0172] En cualquiera de los métodos anteriores, las células T de memoria pueden ser células T CD8⁺ o CD4⁺. En cualquiera de los métodos anteriores, las células T de memoria pueden ser células T de memoria central (T_{CM}) o células T de memoria efectora (T_{EM}).

[0173] Cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente memoria puede encontrar uso en los métodos de la presente divulgación.

[0174] Las proteínas de unión se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación para la detección y cuantificación de uno o más antígenos diana. Las proteínas de unión se unirán a los uno o más antígenos diana con una afinidad que sea apropiada para el método de ensayo que se esté empleando.

[0175] Para aplicaciones de diagnóstico, en determinadas realizaciones, las proteínas de unión se pueden marcar con un radical detectable. El radical detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el radical detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In o ^{67}Ga ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

[0176] Las proteínas de unión también son útiles para la formación de imágenes in vivo. Se puede administrar una proteína de unión marcada con un radical detectable a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se puede analizar la presencia y ubicación del anticuerpo marcado en el anfitrión. La proteína de unión puede marcarse con cualquier radical que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otros medios de detección conocidos en la técnica.

[0177] Para aplicaciones clínicas o de investigación, en determinadas realizaciones, las proteínas de unión se pueden conjugar con un agente citotóxico. Se ha utilizado una variedad de anticuerpos acoplados a agentes citotóxicos (es decir, productos conjugados de anticuerpo-fármaco) para dirigir cargas citotóxicas a células tumorales específicas. Se conocen en la técnica agentes citotóxicos y enlazadores que conjugan los agentes con un anticuerpo; véanse, p. ej., Parslow, A.C. et al. (2016) *Biomedicines* 4:14 y Kalim, M. et al. (2017) *Drug Des. Devel. Ther.* 11: 2265-2276.

[0178] La divulgación también se refiere a un kit que comprende una proteína de unión y otros reactivos útiles para detectar niveles de antígenos diana en muestras biológicas. Tales reactivos pueden incluir una marca detectable, suero de bloqueo, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección. En algunas realizaciones, el kit comprende una composición que comprende cualquier proteína de unión, polinucleótido, vector, sistema de vectores y/o célula anfitriona descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con él. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución intravenosa, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales

como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí sola o combinada con otra composición, eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). En algunas realizaciones, la etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para prevenir, diagnosticar y/o tratar la afección elegida. Alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación o kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Composiciones terapéuticas de proteínas de unión y administración de las mismas

[0179] Las composiciones terapéuticas o farmacéuticas que comprenden proteínas de unión están dentro del alcance de la divulgación. Tales composiciones terapéuticas o farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión, o un producto conjugado de proteína de unión-fármaco, mezclados con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado por su idoneidad con el modo de administración. Estas composiciones farmacéuticas pueden encontrar uso en cualquiera de los métodos y usos descritos en la presente memoria (p. ej., *ex vivo*, *in vitro* y/o *in vivo*).

[0180] Los materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

[0181] La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, carácter isotónico, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina), 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 voluminizantes (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)), agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos (tales como

glucosa, manosa, o dextrinas), proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas), agentes 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 benزالconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenetílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol, o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronicos; PEG, ésteres de sorbitán; polisorbato 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 suministro, diluyentes, excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticos (véase, p. ej., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (18ª Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990), y ediciones posteriores del mismo, incorporadas a la presente memoria como referencia para cualquier propósito).

[0182] Un experto en la técnica determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosis deseada. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de la proteína de unión.

[0183] El vehículo o portador principales en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuados para inyectables puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente con un complemento de otros materiales comunes en las composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ilustrativos adicionales. Otras composiciones farmacéuticas ilustrativas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir adicionalmente sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la divulgación, las composiciones de proteínas de unión se pueden preparar para el almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Adicionalmente, la proteína de unión se puede

formular en forma de un producto liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

[0184] Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden seleccionar para administración parenteral o subcutánea. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para suministro a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del conocimiento práctico de la técnica.

[0185] Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el lugar de administración. Por ejemplo, se utilizan tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, típicamente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

[0186] Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso pueden estar en forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable, 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 se formula una proteína de unión como una solución isotónica estéril, conservada adecuadamente. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bio-erosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poli(láctico) o ácido poli(glicólico)), cuentas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que luego se puede suministrar mediante una inyección de depósito. También se puede utilizar ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de suministro de fármacos implantables.

[0187] En una realización, se puede formular una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, una proteína de unión se puede formular como un polvo seco para inhalación. Las soluciones de inhalación de proteínas de unión también se pueden formular con un propelente para la administración de aerosol. En otra realización más, las soluciones se pueden nebulizar.

[0188] También se contempla que determinadas formulaciones se puedan administrar por vía oral. En una realización de la divulgación, las proteínas de unión que se administran de esta manera se pueden formular con o sin los portadores utilizados habitualmente en la preparación de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el

punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la proteína de unión. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

[0189] Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de proteínas de unión en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

[0190] Las composiciones farmacéuticas adicionales de la divulgación serán evidentes para los expertos en la técnica, incluidas las formulaciones que implican proteínas de unión en formulaciones de suministro sostenido o controlado. Los expertos en la técnica también conocen mecanismos para formular una variedad de otros medios de suministro sostenido o controlado, tales como portadores de liposomas, micropartículas bio-erosionables o cuentas porosas e inyecciones de depósito. Otros ejemplos de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma etilo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), etilenvinilacetato o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica.

[0191] Las composiciones farmacéuticas que se van a utilizar para la administración *in vivo* normalmente deben ser estériles. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización utilizando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral se puede almacenar en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[0192] Una vez formulada la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para utilizar o en una forma (p. ej., liofilizada) que requiera reconstitución antes de la administración.

[0193] La divulgación también incluye kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta divulgación los kits que contienen jeringas precargadas de una o varias cámaras (p. ej., jeringas líquidas y liojeringas).

[0194] La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de proteína de unión que se va a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo, en parte, de la molécula suministrada, la indicación para la que se utiliza 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 la salud general) del paciente. En consecuencia, el médico puede valorar la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo.

[0195] La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la proteína de unión en la formulación que se utilice. Normalmente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. Por tanto, la composición se puede administrar como una dosis única, como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada lo realizan habitualmente los expertos en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que realizan habitualmente. Se pueden determinar las dosificaciones apropiadas mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

[0196] La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con métodos conocidos, p. ej., por vía oral; mediante inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatoso), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; por sistemas de liberación sostenida; o mediante dispositivos de implantación. Cuando se desee, las composiciones se pueden administrar mediante inyección en embolada o continuamente mediante infusión, o mediante un dispositivo de implantación.

[0197] La composición también se puede administrar localmente mediante la implantación de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se haya absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y el suministro de la molécula deseada puede ser mediante difusión, embolada de liberación programada o administración continua.

EJEMPLOS

[0198] Los ejemplos que siguen son ilustrativos de realizaciones específicas de la divulgación y de los diversos usos de la misma. Se exponen únicamente con fines explicativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

[0199] La siguiente terminología se puede utilizar indistintamente en los Ejemplos y Dibujos de la presente memoria para referirse a dominios de unión a antígeno o anticuerpos anti-CD38 específicos:

antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 o CD38_{VH1}

antiCD38_1370 o CD38_{HHY1370}

antiCD38_SB19 o isatuximab

Ejemplo 1: Reactividad cruzada e inducción de la apoptosis de anticuerpos anti-CD38

[0200] Las variantes anti-CD38 humanizadas se caracterizaron por su unión a polipéptidos CD38 humanos y de cinomolgo y por la inducción de apoptosis.

Materiales y Métodos

Afinidad de unión a dominios extracelulares CD38 solubles

[0201] Las propiedades de unión de los mAb anti-CD38 se evaluaron usando un BIAcore 2000 (BIAcore Inc., Uppsala, NJ). Brevemente, se acopló un chip biosensor CM5 BIAcore en el aparato y se activó con 250 µL de NHS/EDC 1:1 a temperatura ambiente. Se inmovilizó una IgG1 anti-Fc humano de ratón (GE Healthcare núm. BR-1008-39) (13,5 µg/mL en tampón acetato 0,05 M, pH 5) sobre los chips activados en las celdas de flujo 1. La inmovilización se llevó a cabo a una velocidad de flujo 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 1M. Para medir la unión de mAb anti-CD38 a la proteína CD38 humana o la proteína CD38 de cinomolgo, se utilizaron anticuerpos a 2 µg/mL en tampón de migración BIAcore (HBS-EP). Se inyectaron antígenos (CD38-histag humano (ID2) o CD38-histag de cinomolgo (ID3)) de 3 a 1000 nM. Una vez completada la fase de inyección, se controló la disociación en un tampón de migración BIAcore a la misma velocidad de flujo durante 360 segundos. La superficie se regeneró entre inyecciones utilizando 30 µL de NaOH 50 mM-NaCl 1 M. Los sensogramas individuales se analizaron utilizando el soporte lógico BIAsimulation.

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

[0202] La unión de anticuerpos anti-CD38 a CD38 expresado en la superficie de células preB::300.19 murinas recombinantes se determinó mediante citometría de flujo. La línea celular recombinante fue descrita por J. Deckket et al. 2014 Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Se recubrieron células murinas que expresaban CD38 preB::300.19 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 anti-IgG humana de cabra conjugado con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; núm. 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 la centrifugación y resuspensión de las células mediante la adición de 200 µl/pocillo BSA al 1% en PBS y se leyó utilizando el Sistema de Citometría de Flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron utilizando el soporte lógico BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

Proteínas CD38 recombinantes

[0203] Se utilizaron varias proteínas CD38 recombinantes derivadas de la isoforma A con diferentes etiquetas y mutaciones puntuales (SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 28), y una versión etiquetada de la isoforma E de CD38 (SEQ ID NO: 105) que abarca el dominio extracelular de CD38 desde R45-P203. Las proteínas se produjeron por expresión transitoria en células de mamífero. Las secuencias de ADN codificantes se clonaron en plásmidos de expresión de mamífero bajo el potenciador/promotor de CMV y señales poliA de SV40. Se transfectaron transitoriamente células HEK293 (Invitrogen; núm. K9000-10) con los plásmidos de expresión utilizando el Sistema de Expresión FreeStyle™ MAX 293 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de inducción de apoptosis

[0204] Las células se incubaron a 2×10^5 células/mL en medio completo (RPMI-1640, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM) con 1,5 mg/mL (10 nM) de anticuerpos indicados durante 20 horas a 37°C con CO₂ al 5%. Las células se tiñeron con Anexina V-FITC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSAria™ con el soporte lógico BD FACSDiva para control de adquisición y análisis de datos (ambos de BD Biosciences).

Ensayos ELISA

[0205] Se recubrieron placas de 96 pocillos con CD38 a 0,5 µg/pocillo en PBS y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpos a la placa. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora y se lavó cinco veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBS-T). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:25.000 de Anti-IgG humana, conjugada con peroxidasa de rábano picante (Jackson Ref: 109-035-098). 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 utilizando el soporte lógico BIST @ T-SPEED.

Resultados

[0206] Se examinaron las propiedades de unión de anticuerpos anti-CD38 humano seleccionados a CD38 humano soluble y CD38 de mono cinomolgo utilizando ELISA, y ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor; Piscataway, NJ). Los datos de ELISA se utilizaron para determinar la CE50 de la unión de los anticuerpos a CD38 humano y de mono cinomolgo para los anticuerpos anti-CD38 humanizados antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3 y para el anticuerpo anti-CD38 humano antiCD38_1370.

[0207] La unión de las variantes anti-CD38 humanizadas o mAb anti-CD38 humano a CD38 también se evaluó utilizando ensayos SPR. Los datos de SPR se utilizaron para determinar la K_D y la k_{off} de la unión del anticuerpo a CD38 humano y de mono cinomolgo para los anticuerpos anti-CD38 humanizados antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3 y el anticuerpo anti-CD38 humano antiCD38_1370. Los datos de unión, resumidos en la Tabla K, muestran que todos los mAb anti-CD38 se unen a CD38 con características de unión similares.

Tabla K. Afinidad de unión de mAb anti-CD38 al dominio extracelular soluble de CD38 humano y CD38 de cinomolgo determinada mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial.

	hCD38-his (SEQ ID NO:2)		cCD38-his (SEQ ID NO:4)	
	Kd (s-1)	KD (M)	Kd (s-1)	KD (M)
antiCD38_C2-CD38-1	2,66E-04	3,36E-10	9,85E-05	3,90E-10
antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1	3,90E-04	3,32E-10	7,84E-04	3,44E-09
antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3	2,83E-04	4,83E-10	1,29E-04	7,10E-10
antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3	5,29E-04	8,22E-10	2,01E-04	1,14E-09
antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3	3,33E-04	3,12E-10	1,25E-04	5,63E-10
antiCD38_1370	2,03E-04	1,44E-09	1,90E-04	1,38E-09

[0208] La capacidad de las variantes anti-CD38 humanizadas para unirse a células que expresan CD38 se evaluó utilizando el ensayo de unión basado en FACS descrito anteriormente. Los datos de FACS se utilizaron para determinar la CE50 de la unión de anticuerpos a CD38 humano y de mono cinomolgo para los anticuerpos anti-CD38 humanizados antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3, antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3, antiCD38_C2-1_VH6-VL3 y el anticuerpo anti-CD38 humano antiCD38_1370. Los datos de unión, expuestos en la Tabla L, muestran que todas las variantes anti-CD38 humanizadas mostraron afinidades de unión similares para CD38 de la superficie celular.

Tabla L. Afinidad de unión de mAb anti-CD38 a células murinas que expresan CD38 preB::300.19.

	KD Aparente FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
antiCD38_C2-CD38-1	2,80E-10	2,20E-10
antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1	3,30E-10	7,50E-10
antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3	7,80E-10	1,31E-09
antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3	5,50E-10	1,15E-09
antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3	6,80E-10	1,07E-09
antiCD38_1370	2,07E-09	1,14E-09

[0209] Los datos de unión de los ensayos ELISA, SPR, y FACS anteriores se resumen en la Tabla L2, junto con la identidad de secuencia de los dominios VH y VL para regiones V humanas.

Tabla L2. Resumen de los ensayos ELISA, SPR, y FACS que caracterizan la unión de los anticuerpos indicados a polipéptidos CD38 humanos (Hu) y de mono cinomolgo (Cino).

	Nomenclatura INN	ELISA CE50 nM		SPR KD nM		FACS CE50 nM		Identidad para la región V humana	
		Hu	Cino	Hu	Cino	Hu	Cino	Hu	Cino
antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1	-zumAb	0,11	0,10	0,33	3,44	0,33	0,76	84,7%	87,1%
antiCD38_C2-CD38-1_VH3-VL3	-zumAb	0,16	0,15	0,48	0,71	0,78	1,31	83,7%	83,9%
antiCD38_C2-CD38-1_VH5-VL3	-zumAb	0,16	0,17	0,82	1,14	0,55	1,15	80,6%	83,9%
antiCD38_C2-CD38-1_VH6-VL3	-zumAb	0,14	0,14	0,31	0,56	0,68	1,06	81,6%	83,9%
antiCD38_1370	-umAb	0,05	0,09	1,44	1,38	2,00	1,14	99,0%	95,8%

[0210] También se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-CD38 para 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 ligado a enzimas (ELISA) utilizando proteínas de isoforma A e isoforma E (preparadas como se describió anteriormente) como antígeno de captura. Se recubrieron placas de 96 pocillos con una de las dos isoformas a 0,5 µg/pocillo en PBS y se añadieron 100 µL/pocillo de anticuerpos a la placa. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora y se lavó cinco veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBS-T). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:25.000 de Anti-IgG humana, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Ref: 109-035-098). 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 leyó a una longitud de onda de 450 nm. Los valores de CE50 se estimaron utilizando el soporte lógico BIOST @ T-SPEED.

[0211] Se determinó la afinidad de unión de varios 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 L3. La Tabla M proporciona una comparación de las propiedades de unión de varios anticuerpos anti-CD38.

Tabla L3. Afinidad de unión de anticuerpos anti-CD38 para las isoformas A y E, basándose en CE50 determinada por ELISA.

Anticuerpo	CD38 isoforma A CE50 (nM)	CD38 isoforma E CE50 (nM)
antiCD38_C2-CD38-1	0,11 (CV 9 %)	0,08 (CV 7%)
antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1	0,14 (CV 13%)	0,10 (CV 12%)
antiCD38_1370	0,47 (CV 3,7%)	0,32 (CV 5%)
antiCD38_SB19	0,10 (CV 7,1%)	Sin unión

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

Anti-CD38	H11 (Santa Cruz)	Daratumumab	antiCD38_SB19	antiCD38_C2-CD38-1	antiCD38_1370
Unión a huCD38 isoforma A	+	+	+	+	+
Unión a huCD38 isoforma E	+	-	-	+	+
Unión a CD38 cino	+	-	-	+	+

[0212] En conclusión, solo antiCD38_C2-CD38-1 se unió a CD38 humano y de mono cinomolgo con afinidad sub-nanomolar y se unió a las isoformas A y E de CD38.

Ejemplo 2: Generación de proteínas de unión anti-CD38 triespecíficas

[0213] A continuación, se analizaron las propiedades de unión de los dominios de unión al antígeno de los anticuerpos anti-CD38 seleccionados descritos en el Ejemplo 1 en el formato inespecífico representado en la **FIG. 1**.

Materiales y Métodos

Producción y purificación de proteínas de unión triespecíficas

[0214] Se produjeron proteínas de unión triespecíficas mediante transfección transitoria de 4 plásmidos de expresión en células Expi293 utilizando el Kit de Transfección ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, 25% (p/p) de cada plásmido se diluyó en Opti-MEM, se mezcló con el reactivo ExpiFectamine prediluido durante 20-30 minutos a temperatura ambiente (RT) y se añadió a las células Expi293 ($2,5 \times 10^6$ células/ml). A menudo se utilizó una optimización de la transfección para determinar la mejor razón de plásmidos con el fin de producir la proteína de unión triespecífica con buen rendimiento y pureza.

[0215] 4-5 días después de la transfección, se recogió el sobrenadante de las células transfectadas y se filtró a través de una unidad de filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (Nalgene). La proteína de unión inespecífica en el sobrenadante se purificó utilizando un procedimiento de 3 etapas. En primer lugar, se utilizó la purificación por afinidad de proteína A, y el Ab unido se hizo eluir utilizando “Tampón de elución de IgG” (Thermo Fisher Scientific). En segundo lugar, el producto se sometió a diálisis frente a PBS (pH 7,4) durante la noche con 2 cambios de tampón PBS. Cualquier producto precipitado se aclaró mediante filtración a través de una unidad de filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (Nalgene) antes de la siguiente etapa. En tercer lugar, se utilizó la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Hiload 16/600 Superdex 200 pg, o Hiload 26/600 Superdex 200 pg, GE Healthcare) para eliminar agregados y diferentes especies en la preparación. Las fracciones se analizaron en SDS-PAGE reducida y no reducida para identificar las fracciones que contenían la proteína de unión triespecífica monomérica antes de combinarlas. El anticuerpo purificado se puede dividir en alícuotas y almacenar a -80°C a largo plazo.

Ensayos ELISA

[0216] Las propiedades de unión de los anticuerpos purificados se analizaron utilizando métodos ELISA o SPR. Para ELISA, se utilizaron los antígenos correspondientes para cada

sitio de unión en la proteína de unión trispecífica para recubrir una placa Immuno de 96 pocillos (Nunc 439454, Thermo Fisher Scientific) durante la noche a 4°C utilizando 2 µg/ml de cada antígeno en PBS (pH 7,4). La placa recubierta se bloqueó utilizando leche desnatada al 5% + BSA al 2% en PBS durante una hora a RT, seguido de lavado con PBS + Tween 20 al 0,25% tres veces (Aqua Max 400, Molecular Devices). Se prepararon diluciones seriadas de anticuerpos (Abs trispecíficos y de control) y se añadieron a las placas de ELISA (100 µl/pocillo por duplicado), se incubaron a RT durante una hora, seguido de un lavado 5 veces con PBS + Tween 20 al 0,25%.

[0217] Después del lavado, se añadió a cada pocillo el anti-Fab humano secundario conjugado con HRP (1:5000, Núm. de Cat. 109-035-097, Jackson ImmunoResearch Inc) y se incubó a RT durante 30 minutos. Después de lavar 5 veces con PBS + Tween 20 al 0,25%, se añadieron a cada pocillo 100 µl de Sustrato de Peroxidasa Microwell TMB (KPL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). La reacción se terminó añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 1 M, y se midió la DO₄₅₀ utilizando SpectraMax M5 (Molecular Devices) y se analizó utilizando el soporte lógico SoftMax Pro6.3 (Molecular Devices). Los datos finales se transfirieron al soporte lógico GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EE.UU.) y se trazaron como se muestra. La CE₅₀ se calculó utilizando el mismo soporte lógico.

[0218] El ensayo ELISA se utilizó para determinar la unión de un anticuerpo trispecífico anti-CD38xCD28xCD3 o un anticuerpo de control de isotipo (IgG4 humana) a CD3 humano (Cambridge Biologics LLC núm. de Cat. 03-01-0051), CD28 (Cambridge Biologics LLC Núm. de Cat. 03-01-0303) y CD38 (Cambridge Biologics LLC Núm. de Cat. 03-01-0369). Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-Fab conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc núm. 109-035-097).

Resultados

[0219] Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se sometieron a prueba en formato trispecífico (anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3) para determinar la capacidad de unirse a CD38 cuando otros dominios de unión al antígeno se unen a sus ligandos afines utilizando SPR. Para la unión secuencial de los tres antígenos a cada Ab trispecífico, se inyectó una concentración de saturación (> 10 KD) de cada antígeno durante 8 min seguido de 5 min de disociación. La regeneración de la superficie se llevó a cabo inyectando glicina-HCl 10 mM pH 2,5 durante 60 segundos a 30 µl/min. Los datos se ajustaron con un modelo de unión cinética 1:1 y se analizaron utilizando el Soporte Lógico de Evaluación Biacore S200 v 1.0.

La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó utilizando la constante de velocidad de asociación (k_{on}) y la constante de velocidad de disociación (k_{off}).

[0220] Este ensayo basado en SPR mostró que las proteínas de unión triespecíficas eran capaces de unirse a CD38 independientemente de si los dominios de unión al antígeno CD3 y/o CD28 también estaban unidos a su antígeno afin. Los parámetros cinéticos medidos por SPR se proporcionan en la Tabla M2.

Tabla M2. Unión de proteínas de unión anti-CD38xanti-CD28xanti-CD3 triespecíficas 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)
Sin unión previa	9,02E+05	1,42E-03	1,57E-09
CD3 unido previamente	8,35E+05	1,24E-03	1,48E-09
CD28 unido previamente	7,39E+05	1,32E-03	1,79E-09
CD3 unido previamente, a continuación CD28	8,18E+05	1,23E-03	1,50E-09
CD28 unido previamente, a continuación CD3	8,37E+05	1,23E-03	1,47E-09

[0221] Estos resultados demuestran que las tres dianas se pueden unir 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.

[0222] A continuación, se evaluó mediante SPR cada dominio de unión a antígeno de la proteína de unión triespecífica CD38_{SB19}xCD28_{sup}xCD3_{mid}, para determinar la capacidad de unirse al antígeno afin 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

[0223] Como se demuestra en las Tablas M3 y M4, tener dos dianas saturadas por unión previa con el antígeno no afectó a la cinética o a la afinidad de unión de la tercera diana para CD38 o CD28. En el caso de la unión de CD3, CD38 y/o CD28 unidos previamente dieron como resultado una cinética más rápida (impacto de aproximadamente 4 veces en los valores de k_{on} y k_{off}).

[0224] Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 se sometieron a prueba en formato triespecífico con dos dominios de unión a antígeno anti-CD28 (super agonista, "sup" y agonista convencional, "cvn") y dos dominios de unión a antígeno anti-CD3 ("mid" y "low"). Las secuencias de dominios variables 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 de SPR que examinan la unión de proteínas de unión triespecíficas se muestran en la **FIG. 2**. Tres dominios de unión anti-CD38 tenían 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 tenían aproximadamente la misma afinidad de unión en formatos mono-, bi- y tri-específicos. Los dominios de unión a CD28 mostraron una afinidad de unión ligeramente menor (pero aún nanomolar) en formato bi- o tri-específico 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.

[0225] Los dominios de unión a antígeno anti-CD38 generados en la presente memoria también se compararon con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 existente de antiCD38_SB19 (véanse SEQ ID NO: 47 para VH y SEQ ID NO: 48 para las secuencias VL, respectivamente). La unión de moléculas triespecíficas a CD38 expresado sobre la superficie de células recombinantes preB::300.19 murinas se determinó mediante citometría de flujo y se sometieron a ensayo en paralelo los correspondientes anticuerpos monovalentes anti-CD38. La línea celular recombinante fue descrita por J. Deckket et al. 2014 en Clin. Cancer Res 20:4574-4583. Se recubrieron células murinas 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 anti-IgG humana de cabra conjugado con Alexa488 (Jackson ImmunoResearch; núm. 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 la centrifugación y resuspensión de las células mediante la adición de 200 µL/pocillo de BSA al 1% en PBS y se leyó con el Sistema de Citometría de Flujo Guava® easyCyte™ 8HT. Los valores de KD aparente y CE50 se estimaron utilizando el soporte lógico BIOST@T-BINDING y BIOST@T-SPEED, respectivamente.

[0226] Se utilizó la citometría de flujo como se describió anteriormente para examinar la unión del anticuerpo antiCD38_SB19 o la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_SB19 a las células pre-B murinas que expresaban el polipéptido CD38 humano o de mono cinomolgo sobre su superficie celular. La proteína de unión triespecífica CD38xCD28^{sup} xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_SB19 se unió a células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 8 veces menor (CE50 = 4 nM) que el anticuerpo monoespecífico antiCD38_SB19 (CE50 = 0,5 nM). Ni el anticuerpo monoespecífico antiCD38_SB19 ni la proteína de unión triespecífica con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_SB19 se unieron a las células que expresaban CD38 de cinomolgo.

[0227] El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 también se sometió a prueba en formatos triespecíficos para determinar la unión a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de cinomolgo. A diferencia de antiCD38_SB19, las proteínas de unión triespecíficas CD38xCD28^{sup} xCD3_{mid} y CD38xCD28_{cvn} xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, así como el anticuerpo monoespecífico antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1, fueron capaces de unirse a polipéptidos CD38 tanto humanos como de mono cinomolgo. La

proteína de unión trispecífica CD38xCD28_{cvn}xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 se unió a células que expresan CD38 humano con una afinidad aparente 9 veces menor (CE50 = 4,4 nM) que el anticuerpo antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 parental (CE50 = 0,5 nM). La proteína de unión trispecífica CD38xCD28_{cvn}xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 se unió a las células que expresaban CD38 de cinomolgo con una afinidad aparente 7,5 veces menor (CE50 = 7,5 nM) que el anticuerpo antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 parental (CE50 = 1 nM). La proteína de unión trispecífica CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 se unió a células que expresaban CD38 humano con una afinidad aparente 2,5 veces menor (CE50 = 11 nM) que la proteína de unión trispecífica CD38xCD28_{cvn}xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1 (CE50 = 4,4 nM).

[0228] El dominio de unión del anticuerpo anti-CD38 humanizado antiCD38_1370 también se comparó con el anticuerpo monoespecífico antiCD38_1370 para determinar la unión a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de cinomolgo. Mientras que el anticuerpo monoespecífico antiCD38_1370 se unía a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos (CE50 = 11,2 nM) o de mono cinomolgo (CE50 = 6,6 nM) en el intervalo nM, la proteína de unión trispecífica CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid} con el dominio de unión a antígeno anti-CD38 antiCD38_1370 se unió a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de mono cinomolgo sin saturación.

[0229] En conclusión, se encontró que la afinidad para la unión de la proteína de unión trispecífica CD38_{SB19}xCD28_{sup}xCD3_{mid} (dominio de unión antiCD38_SB19 anti-CD38) a CD38 humano se encontraba en el mismo intervalo, ya sea examinando la unión a CD38 humano recombinante por SPR o a CD38 humano expresada sobre la superficie celular por citometría de flujo (**FIG. 3**). De manera similar, la afinidad de las proteínas de unión trispecíficas CD38_{VH1}xCD28_{sup}xCD3_{mid/low} (dominio de unión anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1) y CD38_{VH1}xCD28_{cvn}xCD3_{mid/low} (dominio de unión anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1) para la unión a CD38 humano también estaba en el mismo intervalo en ambos ensayos. Para CD38_{HHY1370}xCD28_{sup}xCD3_{mid} (dominio de unión anti-CD38 antiCD38_1370), se determinó mediante SPR que la K_D para la unión de CD38 humano era 1 nM, mientras que no se pudo estimar un valor de CE50 preciso mediante citometría de flujo (**FIG. 3**). En la Tabla M5 se proporciona un resumen de los valores de K_D aparentes (obtenidos mediante análisis FACS) de proteínas de unión trispecíficas con varios dominios de unión anti-CD38.

Tabla M5. Resumen de valores de KD aparentes obtenidos mediante ensayos de citometría de flujo.

	KD Aparente FACS (M)	
	Células que expresan hCD38	Células que expresan cCD38
Triespecífica con dominio de unión anti-CD38 antiCD38_C2-CD38-1 VH1-VL1	4,4 nM	7,5 nM
Triespecífica con dominio de unión anti-CD38 antiCD38_1370	Sin saturación	Sin saturación
Triespecífica con dominio de unión anti-CD38 antiCD38_SB19	4 nM	Sin unión
	KD Aparente FACS (M)	
	<i>Células que expresan hCD38</i>	<i>Células que expresan cCD38</i>
antiCD38_C2-CD38-1_VH1-VL1	<i>0,5 nM</i>	<i>1 nM</i>
antiCD38_1370	<i>11,2 nM</i>	<i>6,6 nM</i>
antiCD38_SB19	<i>0,5 nM</i>	<i>Sin unión</i>

[0230] Como era de esperar, la proteína de unión triespecífica Δ CD38xCD28_{sup}xCD3_{mid} que carecía del dominio de unión anti-CD38 no se unió a células que expresaban polipéptidos CD38 humanos o de mono cinomolgo. Esto indica que la unión observada en este ensayo fue específica para los dominios de unión al antígeno CD38.

Ejemplo 3: El Ab contra CD38/CD3xCD28 estimula CD4 y CD8 de memoria central, Th1 y las respuestas específicas de antígeno

[0231] Para determinar si el Ab triespecífico contra CD38/CD3xCD28 podía mejorar la función inmunitaria celular, se evaluó el fenotipo de células T expandidas *in vitro*.

Materiales y Métodos

[0232] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre de donantes humanos sanos recogidas por Research Blood Components, LLC (Boston, Mass.). Las PBMC se añadieron a las placas recubiertas de anticuerpo (350 ng/pocillo) (5×10^5 células/mL), como se describe previamente anteriormente, y se incubaron a 37°C durante 3 y 7 días. Las células se recolectaron en puntos de tiempo específicos y se analizaron mediante

citometría de flujo para los subconjuntos de células T: vírgenes (CCR7⁺ CD45RO⁻), Tcm (CCR7⁺ CD45RO⁺), Tem (CCR7⁻ CD45RO⁺), Tregs (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25^{hi}). Las 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 células T CD8⁺ específicas de pp65 de CMV utilizando pentámero conjugado con fluorescencia restringido al HLA de los donantes de PBMC (A*02:01/NLVPMVATV) (ProImmune, Oxford, Reino Unido). Las PBMC se obtuvieron de HemaCare (Van Nuys, CA) de donantes con poblaciones positivas para CMV y tipos de HLA conocidos. Se utilizaron como control negativo PMBC de donantes negativos para el tipo de HLA restrictivo. La tinción se realizó según el protocolo del fabricante.

Resultados

[0233] Las PBMC humanas de donantes infectados con CMV se incubaron durante 7 días con el Ab triespecífico o un anticuerpo triespecífico de control negativo con tres sitios de unión al antígeno mutado en ausencia de citocinas. El análisis de los subconjuntos de CD4 reveló la mayor proliferación en el grupo de memoria central, con un menor aumento en las células de memoria efectora (**FIG. 4A**). El análisis del subconjunto de CD4 también reveló la mayor proliferación de células Th1 (> 6 veces) en comparación con las células Th2 o Th17 (**FIG. 4B**). En el subconjunto de CD8, hubo un aumento >150 veces en el subconjunto de CD8 de memoria central el día 7, con un aumento menor en las células de memoria efectora (**FIG. 4C**). Es importante destacar que las respuestas CD8 específicas de antígeno preexistentes al CMV, dirigidas al epítipo pp65 en donantes HLA-A2 seropositivos mediante tinción con tetrámero (Gratama JW, van Esser JW, et al. *Blood* **98**:1358-1364 (2001)), se incrementó >44 veces en presencia de triespecífico contra CD38 en comparación con el control negativo (**FIG. 4D**).

[0234] Tomados en conjunto, estos datos indican que el Ab triespecífico contra CD38 estimula la función de Th1 y las respuestas protectoras de las células T de memoria CD8 que es probable que mejoren la inmunidad antitumoral y antiviral *in vivo*.

Ejemplo 4: Los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la respuesta inmunitaria específica de CMV

[0235] La activación y/o proliferación de células T específicas de antígenos virales podría proporcionar una estrategia terapéutica contra infecciones virales, tales como las infecciones

por citomegalovirus (CMV). Se determinó la capacidad de los anticuerpos trispecíficos contra CD38/CD28xCD3 para promover la activación y expansión de las células T específicas de CMV.

Materiales y Métodos

Ensayos ELISA

[0236] Las afinidades de unión a cada antígeno diana por los acopladores de células T CD38/CD28xCD3 se midieron mediante ELISA. Brevemente, cada antígeno se utilizó para recubrir la Immuno Plate de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) durante la noche a 4°C utilizando 200 ng/pocillo en PBS (pH 7,4) de cada antígeno. La placa recubierta se bloqueó utilizando leche desnatada al 5% + BSA al 2% en PBS durante una hora a RT, seguido de lavado con PBS + Tween 20 al 0,25% tres veces (Aqua Max 400, Molecular Devices). Se prepararon diluciones seriadas de anticuerpos (Ab de control y trispecíficos) y se añadieron a las placas ELISA (100 µl/pocillo por duplicado), se incubaron a RT durante una hora y se lavaron 5 veces con PBS + Tween 20 al 0,25%. Después del lavado, Se añadió el anti-Fab humano secundario conjugado con HRP (1:5000, Núm. de Cat. 109-035-097, Jackson ImmunoResearch Inc) a cada pocillo y se incubó a RT durante 30 minutos. Después de lavar 5 veces con PBS + Tween 20 al 0,25%, se añadieron a cada pocillo 100 µl de TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL, Gaithersburg, Maryland, EE. UU.). La reacción se terminó añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 1 M, y se midió la DO450 utilizando SpectraMax M5 (Molecular Devices) y se analizó utilizando el soporte lógico SoftMax Pro6.3 (Molecular Devices). Los datos finales se transfirieron al soporte lógico GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EE. UU.) y se trazaron. La CE50 se calculó utilizando el mismo soporte lógico.

Ensayos SPR

[0237] Se utilizaron antígenos CD38-His humanos (Cambridge Biologics, Cambridge, Mass.) Para el análisis cinético completo. La caracterización cinética de los anticuerpos purificados se realizó utilizando tecnología SPR en un BIACORE 3000 (GE Healthcare). Se utilizó un ensayo de captura que utiliza captura de anticuerpos específicos de IgG1 humana y orientación de los anticuerpos investigados. Para la captura de construcciones de proteínas que contienen Fc, se utilizó el kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare). Para la captura del antígeno marcado con His, se utilizó un kit de captura de anticuerpos anti-His (GE Healthcare). El anticuerpo de captura se inmovilizó mediante grupos de amina primaria

(11000 RU) en un chip CM5 de grado de investigación (GE Life Sciences) utilizando procedimientos convencionales. El anticuerpo analizado se capturó a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ con un valor de UR ajustado que daría como resultado una señal de unión de analito máxima de típicamente 30 UR. La cinética de unión se midió frente a los anticuerpos específicos. Como tampón de ensayo se utilizó HBS EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,005%) a una velocidad de flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las superficies de los chips se regeneraron con la solución de regeneración del respectivo kit de captura. Los parámetros cinéticos se analizaron y calcularon en el paquete del programa de evaluación BIA v4.1 utilizando una celda de flujo sin anticuerpo capturado como referencia y el modelo de unión de Langmuir 1:1 con transferencia de masa.

Medición in vitro de la proliferación de células T

[0238] Se aislaron células T de donantes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas mediante selección negativa utilizando un Pan T Cell Isolación Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania) magnético. Los anticuerpos se recubrieron sobre placas de cultivo celular de 96 pocillos preparando los anticuerpos en PBS estéril y dispensando 50 μl a cada pocillo (350 ng/pocillo). A continuación, las placas se incubaron a 37°C durante al menos 2 horas y a continuación se lavaron con PBS estéril. Las células T intactas se añadieron a las placas recubiertas de anticuerpo (5×10^5 células/ml) y se incubaron a 37°C durante varios días. Las células se pasaron con nuevos medios de cultivo celular sobre placas recién recubiertas con anticuerpo el día 4. En ciertos experimentos con 7 días de incubación, solo se añadió medio nuevo sin cambiar a una placa nueva recubierta con anticuerpo. Las células se recogieron en puntos de tiempo específicos y se calcularon los números de células utilizando cuentas de recuento CountBright™.

Ensayo de proliferación de células T in vitro y determinación de subconjuntos de células T

[0239] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre de donantes humanos sanos recolectadas por Research Blood Components, LLC (Boston, MA). Las PBMC se añadieron a placas recubiertas de anticuerpo (350 ng/pocillo) (5×10^5 células/ml), como se ha descrito previamente anteriormente, y se incubaron a 37°C durante 3 y 7 días. Las células se recolectaron en puntos de tiempo específicos y se analizaron mediante citometría de flujo para los subconjuntos de células T: virgen (CCR7 + CD45RO⁻), T_{cm} (CCR7 + CD45RO⁺), T_{em} (CCR7 - CD45RO⁺), T_{regs} (CD4 + Foxp3 + CD25^{hi}). Las 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 células T CD8+ específicas de CMV pp65, BMLF específicas de EBV, MP específicas de Influenza A y Gag específicas de VIH-1 utilizando pentámero conjugado fluorescente restringido al HLA/péptido viral de los donantes de PBMC (A*02:01/NLVPMVATV; SEQ ID NO: 26), (A*02: 01/GLCTLVAML; SEQ ID NO: 27), (A*02: 01/GILGFVFTL; SEQ ID NO: 28) y (A*02: 01/SLYNTVATL; SEQ ID NO: 25) respectivamente (ProImmune, Oxford, Reino Unido). Las PBMC se obtuvieron de HemaCare (Van Nuys, CA) para donantes con CMV, EBV o Influenza A conocidos, y de BioIVT (Westbury, NY) para donantes con positividad para VIH-1 y tipos de HLA conocidos. Se utilizó como control negativo PMBC de donantes negativos para el tipo de HLA restrictivo. La tinción se realizó según el protocolo del fabricante.

Cuantificación de células T específicas de CMV

[0240] Como se describió anteriormente, las PBMC se aislaron de sangre de donantes humanos infectados con CMV conocidos y se añadieron a placas que contenían el anticuerpo triespecífico o el anticuerpo de control. Las placas se incubaron a 37°C. Las células se recogieron en los puntos de tiempo indicados y se analizaron como se describe anteriormente.

Resultados

[0241] El anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8+ de memoria específicas de CMV después de la incubación durante hasta 10 días con PBMC aisladas de donantes humanos infectados con CMV B (**FIG. 5A-5B**) y donante C humano infectado con CMV (**FIG. 6A-6B**). Como se muestra en la **FIG. 5A** (donante B de CMV) y la **FIG. 6A** (Donante C de CMV), el anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} condujo a aumentos en las células T CD8+ de memoria específicas de CMV (células/ μ l) con relación al anticuerpo de control triple mutante. Además, el anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} aumentó el porcentaje de células de memoria efectora CD8+ específicas de CMV (T_{em}) y de memoria central (T_{cm}) con relación al anticuerpo de control triple mutante (Donante B de CMV, **FIG. 5B**; Donante C de CMV, **FIG. 6B**).

[0242] Tomados en conjunto, estos datos indican que los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la activación y expansión de células T específicas de CMV, tales como células T CD8+ específicas de CMV, células T CD8+ de memoria efectora específicas de CMV (T_{em}) y células T CD8+ de memoria central (T_{cm}) específicas de CMV.

Ejemplo 5: Los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la respuesta inmunitaria específica de EBV

[0243] A continuación, se determinó la capacidad de los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 para promover la activación y expansión de las células T específicas del virus de Epstein-Barr (EBV).

Materiales y Métodos

Cuantificación de células T específicas de EBV

[0244] Como se describió anteriormente, las PBMC se aislaron de sangre de donantes humanos infectados con EBV conocidos y se añadieron a placas que contenían el anticuerpo triespecífico o el anticuerpo de control. Las placas se incubaron a 37°C. Las células se recogieron en los puntos de tiempo indicados y se analizaron como se describió anteriormente.

Resultados

[0245] El anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV después de la incubación durante hasta 11 días con PBMC aisladas de un donante A humano infectado con EBV (**FIG. 7A-7B**) y un donante B humano infectado con EBV (**FIG. 8A-8B**). Como se muestra en la **FIG. 7A** (donante A de EBV) y la **FIG. 8A** (donante B de EBV), el anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} condujo a aumentos en las células T CD8⁺ de memoria específicas de EBV (células/ μ l) con relación al anticuerpo de control triple mutante. Además, el anticuerpo triespecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} aumentó el porcentaje de células T_{em} CD8⁺ específicas de EBV y células T_{cm} con relación al anticuerpo de control triple mutante (donante A de EBV, **FIG. 7B**; donante B de EBV, **FIG. 8B**, p. ej., véase el día 7).

[0246] Tomados en conjunto, estos datos indican que los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la activación y expansión de células T específicas de EBV, tales como células T CD8⁺ específicas de EBV, células T CD8⁺ de memoria efectora específicas de EBV (T_{em}) y células T CD8⁺ de memoria central (T_{cm}) específicas de EBV.

Ejemplo 6: Los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la respuesta inmunitaria específica de VIH

[0247] A continuación, se determinó la capacidad de los anticuerpos triespecíficos contra CD38/CD28xCD3 para promover la activación y expansión de las células T específicas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Materiales y Métodos

Cuantificación de células T específicas de VIH

[0248] Como se describió anteriormente, las PBMC se aislaron de sangre de donantes humanos infectados con VIH conocidos y se añadieron a placas que contenían el anticuerpo trispecífico o anticuerpo de control. Las placas se incubaron a 37°C. Las células se recogieron en los puntos de tiempo indicados y se analizaron como se describió anteriormente.

Resultados

[0249] El día 0 (antes de la incubación con los anticuerpos trispecíficos), las PBMC de donantes positivos para VIH exhiben células T CD8 específicas de Gag de VIH (A* 02:01 - SLYNTVATL (gag de VIH-1 p17 76-84) Pentamer conjugado con PE, ProImmune) (**FIG. 9**). Por ejemplo, tres donantes de PBMC positivos para VIH tenían 0,86% (donante A de VIH), 0,95% (donante B de VIH) y 2,27% (donante C de VIH) de células T CD8 específicas de Gag en comparación con 0,33% en las PBMC de un donante negativo para VIH.

[0250] La incubación de las PBMC durante un máximo de 10 días con anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T específicas de VIH. Como se muestra en la **FIG. 10A** (Donante D de VIH), **FIG. 11A** (Donante E de VIH) y **FIG. 12A** (Donante F de VIH), el anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} condujo a aumentos en las células T CD8⁺ de memoria específicas de VIH (células/μl) con relación al anticuerpo de control triple mutante. Además, el anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} aumentó el porcentaje de células de memoria efectora (T_{em}) CD8⁺ específicas de VIH (p. ej., véanse los días 7 y 10), y también, en menor grado, las células de memoria central (T_{cm}) CD8⁺, con respecto al anticuerpo de control triple mutante (Donante D de VIH, **FIG. 10B**; Donante E de VIH, **FIG. 11B**; Donante F de VIH, **FIG. 12B**).

Ejemplo 7: Los anticuerpos trispecíficos contra CD38/CD28xCD3 promueven la respuesta inmunitaria específica de Influenza

[0251] Se determinó la capacidad de los anticuerpos trispecíficos contra CD38/CD28xCD3 para promover la activación y expansión de las células T específicas de influenza.

Materiales y Métodos

Cuantificación de células T específicas de influenza

[0252] Como se describió anteriormente, las PBMC se aislaron de sangre de donantes humanos infectados con influenza A conocidos y se añadieron a placas que contenían el anticuerpo trispecífico o el anticuerpo de control. Las placas se incubaron a 37°C. Las células se recogieron en los puntos de tiempo indicados y se analizaron como se describió anteriormente.

Resultados

[0253] El anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} activó las células T y promovió la proliferación de células T CD8⁺ de memoria específicas de influenza después de la incubación durante hasta 11 días con PBMC aisladas de un donante humano infectado con influenza conocido. **FIG. 13A-13B** (Donante de Influenza A). Como se muestra en la **FIG. 13A**, el anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} condujo a aumentos en las células T CD8⁺ de memoria específicas de influenza (células/ μ l) con relación al anticuerpo de control triple mutante. Además, el anticuerpo trispecífico contra CD38_{VH1}/CD28_{sup} x CD3_{mid} aumentó el porcentaje de células T_{em} CD8⁺ específicas de influenza (gripe) (p. ej., véanse los días 7 y 11) y células T_{em} (p. ej., véase el día 7) con relación al anticuerpo de control triple mutante (**FIG. 13B**).

[0254] Tomados en conjunto, los datos presentados en los Ejemplos 1-7 demuestran que los anticuerpos anti-CD38/CD3/CD28 trispecíficos estimulan una potente inmunidad antiviral contra diversos virus. Sin desear estar ligados a ninguna teoría, se cree que los anticuerpos específicos contra CD38/CD3/CD28 pueden activar y promover la proliferación de células T acoplando los tres ligandos en las células T. En particular, se cree que el acoplamiento de CD3/CD28 en células T por anticuerpos específicos de CD38/CD3/CD28 inicia la activación, proliferación y diferenciación de células T en células T de memoria. Además, sin desear estar ligados a ninguna teoría, se cree que el acoplamiento de CD28 proporciona una señal co-estimuladora ventajosa que mejora la duración y magnitud de la respuesta inmunitaria y promueve la proliferación y supervivencia de células T.

[0255] Si bien la divulgación incluye varias realizaciones, se entiende que a los expertos en la técnica se les ocurrirán variaciones y modificaciones. Por lo tanto, se pretende que las reivindicaciones adjuntas cubran todas las variaciones equivalentes que entran dentro del alcance de la divulgación. Además, los títulos de las secciones utilizados en la presente memoria son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del tema descrito.

[0256] Cada realización descrita en la presente memoria se puede combinar con cualquier otra realización o realizaciones a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica o realización indicada como preferida o ventajosa se puede combinar con cualquier otra característica o características o realización o realizaciones indicadas como preferidas o ventajosas, a menos que se indique claramente lo contrario.

[0257] Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan expresamente como referencia en la presente memoria.