MOLÉCULAS AGONISTAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO CD28 QUE ACTÚAN SOBRE EL TUMOR

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre el tumor caracterizadas por la unión monovalente a CD28, métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen estas moléculas y su uso como inmunomoduladores en el tratamiento del cáncer.

ANTECEDENTES

El inmunotratamiento contra el cáncer se está convirtiendo en una opción de tratamiento cada vez más eficaz que puede producir respuestas drásticas y duraderas en tipos de cáncer tales como melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células renales. Esto se debe mayormente al éxito de varios bloqueos del punto de control inmunitario, que incluyen anti-PD-1 (por ejemplo, Keytruda, Merck; Opdivo, BMS), anti-CTLA-4 (por ejemplo, Yervoy, BMS) y anti-PD-L1 (por ejemplo, Tecentriq, Roche). Estos agentes probablemente sirvan como tratamientos de referencia para muchos tipos de cáncer, o como la estructura principal de tratamientos conjuntos; no obstante, solo una fracción de los pacientes (<25 %) se beneficia de dichos tratamientos. Además, diversos tipos de cáncer (cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, sarcomas, cáncer de mama no triple negativo, etc.) presentan resistencia primaria a estos inmunomoduladores. Varios informes indican que la ausencia de linfocitos T antitumorales preexistentes contribuye a la ausencia de respuesta o a una respuesta poco favorable de algunos pacientes. En síntesis, a pesar de los notables efectos antineoplásicos de los inmunotratamientos actuales, existe una clara necesidad médica de tratar a una gran población de pacientes con cáncer y de desarrollar tratamientos que apunten a inducir y mejorar las respuestas novedosas de los linfocitos T específicos del tumor.

CD28 es el miembro fundador de una subfamilia de moléculas coestimuladoras caracterizadas por tener dominios apareados de la superfamilia de inmunoglobulinas de serie V (IgSF) unidos a dominios transmembrana y dominios citoplásmicos únicos que contienen motivos de señalización críticos (Carreno y Collins, 2002). Otros miembros de la subfamilia incluyen ICOS, CTLA-4, PD1, PD1H, TIGIT y BTLA (Chen y Flies, 2013). La

expresión de CD28 se limita a linfocitos T y tiene prevalencia en todos los subconjuntos indiferenciados y en la mayoría de los subconjuntos con experiencia con antígenos, que incluye aquellos que expresan PD-1 o CTLA-4. CD28 y CTLA-4 son altamente homólogos y compiten para unirse a las mismas moléculas B7, CD80 y CD86, que se expresan en células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y células tumorales (Linsley *et al.*, 1990). La mayor afinidad de CTLA-4 por la familia B7 de ligandos le permite a CTLA-4 superar a CD28 con respecto a la unión al ligando y suprimir las respuestas de los linfocitos T efectores (Engelhardt *et al.*, 2006). En cambio, PD-1 mostró inhibir la señalización de CD28 mediante, en parte, la desfosforilación del dominio citoplásmico de CD28 (Hui *et al.*, 2017). La ligadura de CD28 mediante CD80 o CD86 en la superficie de células presentadoras de antígeno profesionales es estrictamente necesaria para el cebado *de novo* funcional de linfocitos T indiferenciados, la expansión clonal posterior, la producción de citocina, la lisis de células diana y la formación de memoria duradera. La unión de ligandos de CD28 también promueve la expresión de receptores coestimuladores inducibles, tales como OX-40, ICOS y 4-1BB (evaluado en Acuto y Michel, 2003). Luego de la ligadura de CD28, un homodímero ligado por disulfuro, el motivo YMNM proximal de membrana y el motivo PYAP distal mostraron formar complejos con varias quinasas y proteínas adaptadoras (Boomer y Green, 2010). Estos motivos son importantes para la inducción de la transcripción de IL2, que está mediada por la activación de NFAT dependiente de CD28, los factores de transcripción de la familia AP-1 y NFκB (Fraser *et al.*, 1991) (June *et al.*, 1987) (Thompson *et al.*, 1989). No obstante, se encuentran sitios adicionales escasamente caracterizados para la fosforilación y ubiquitinación dentro del dominio citoplásmico de CD28. Como fue evaluado por (Esensten *et al.*, 2016), las vías iniciadas por CD28 tienen funciones fundamentales en la promoción de la proliferación y la función efectora de los linfocitos T convencionales. La ligadura de CD28 también promueve la función antiinflamatoria de los linfocitos T reguladores. CD28 coestimula los linfocitos T mediante, en parte, la aumentación de las señales desde el receptor de linfocitos T, pero también mostró mediar eventos de señalización únicos (Acuto y Michel, 2003; Boomer y Green, 2010; June *et al.*, 1987). Las señales específicamente activadas por CD28 controlan muchos aspectos importantes de la función de los linfocitos T, que incluyen la fosforilación y otras modificaciones posteriores a la traducción de proteínas en flujo descendente (por ejemplo, la fosforilación mediada por PI3K), cambios transcripcionales (por ejemplo, la expresión de Bcl-xL), cambios epigenéticos (por ejemplo, el promotor IL-2), remodelación del citoesqueleto (por ejemplo, la orientación del centro organizador de microtúbulos) y cambios en la tasa glucolítica (por ejemplo, el flujo glucolítico). Los ratones con deficiencia de CD28 tienen respuestas reducidas a

patógenos infecciosos, antígenos de aloinjertos, enfermedad de injerto contra huésped, hipersensibilidad por contacto y asma (Acuto y Michel, 2003). La falta de coestimulación mediada por CD28 genera una menor proliferación de linfocitos T *in vitro* e *in vivo*, inhibición intensa de formación de centros germinales y cambio de clase de isotipo de inmunoglobulinas, menor diferenciación de linfocitos T colaboradores (Th) y expresión de citocina de tipo Th2. Las respuestas de los linfocitos T CD8+ citotóxicos dependientes de CD4 también se ven afectadas. Cabe destacar que los linfocitos T indiferenciados con deficiencia de CD28 mostraron una menor respuesta proliferativa particularmente a menores concentraciones de antígenos. Cada vez existe más literatura que respalda la idea de que el acoplamiento de CD28 a linfocitos T tiene potencial antitumoral. Existe evidencia reciente que demuestra que los efectos antineoplásicos de PD-L1/PD-1 y los inhibidores del punto de control CTLA-4 dependen de CD28 (Kamphorst *et al.*, 2017; Tai *et al.*, 2007). Los estudios clínicos que investigan los efectos terapéuticos de CTLA-4 y el bloqueo de PD-1 mostraron resultados excepcionalmente prometedores en pacientes con melanoma avanzado y otros tipos de cáncer. Además, la infusión de linfocitos T modificados por ingeniería genética que expresan receptores de linfocitos T quiméricos artificiales que comprenden un dominio extracelular de reconocimiento de antígenos fusionado a los dominios intracelulares de señalización TCR (CD3z) y a los dominios intracelulares coestimuladores (CD28 y/o dominios 4-1BB) mostró tasas altas y durabilidad de la respuesta en cáncer de linfocitos B y otros tipos de cáncer.

Los anticuerpos agonistas de CD28 se pueden dividir en dos categorías: (i) anticuerpos superagonistas de CD28 y (ii) anticuerpos agonistas de CD28 convencionales. Normalmente, para la activación de linfocitos T indiferenciados se necesita el acoplamiento del receptor de antígenos de linfocitos T (TCR, señal 1) y la señalización coestimuladora mediante CD28 (señal 2). Los superagonistas de CD28 (CD28SA) son anticuerpos monoclonales específicos de CD28, que pueden activar de manera autónoma linfocitos T sin acoplamiento evidente de receptores de linfocitos T (Hünig, 2012). En roedores, CD28SA activa linfocitos T convencionales y reguladores. Los anticuerpos CD28SA son terapéuticamente eficaces en múltiples modelos de autoinmunidad, inflamación y trasplante. No obstante, un estudio de fase I del anticuerpo TGN1412 contra CD28SA humano generó una tormenta de citocina potencialmente mortal en 2006. Los estudios de seguimiento indicaron que la toxicidad se generó por errores en la dosificación debido a diferencias en el grado de respuestas a CD28 de los linfocitos T humanos y los linfocitos T de modelos preclínicos de animales. Actualmente, TGN1412 se está volviendo a evaluar en un estudio abierto, multicéntrico, de aumento de

la dosis en pacientes con RA y pacientes con tumores malignos sólidos avanzados metastásicos o irresecables. Los anticuerpos agonistas de CD28 convencionales, tal como clon 9.3, imitan a los ligandos naturales de CD28 y solo pueden mejorar la activación de linfocitos T en presencia de una señal del receptor de linfocitos T (señal 1). Los descubrimientos publicados indican que el epítopo de unión del anticuerpo tiene un impacto importante en la determinación de si el anticuerpo agonista es un superagonista o un agonista convencional (Beyersdorf *et al.*, 2005). El superagonista TGN1412 se une a un motivo lateral de CD28, mientras que la molécula agonista convencional 9.3 se une cerca del epítopo de unión al ligando. Como consecuencia de los diferentes epítopos de unión, los anticuerpos superagonistas y agonistas convencionales difieren en su capacidad para formar complejos lineales de moléculas de CD28 en la superficie de linfocitos T. Precisamente, TGN1412 puede formar disposiciones lineales de CD28 de manera eficaz, lo que supuestamente produce componentes de señalización agregados que son suficientes para superar el umbral para la activación de linfocitos T. El agonista convencional 9.3, por otro lado, produce complejos que no son de estructura lineal. Se publicó previamente un intento por convertir aglutinantes agonistas convencionales con base en el clon 9.3 (Otz *et al.*, 2009) mediante el uso de un anticuerpo monocatenario biespecífico recombinate dirigido a un proteoglucano asociado a melanoma y CD28. Se informó que el anticuerpo monocatenario biespecífico informado ejerció una actividad “supraagonista” a pesar del uso de un aglutinante agonista 9.3 de CD28 convencional, en función de la tendencia intrínseca de los anticuerpos monocatenarios biespecíficos para formar constructos multiméricos.

Se descubrió que se logra una mejor activación de los linfocitos T cuando se combinan cantidades reducidas de anticuerpos biespecíficos anti-CD3, es decir, anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB), tal como CEA-TCB, con moléculas agonistas anti-CD28. Dado que CD28 se expresa en el inicio en linfocitos T en diversas indicaciones de tumor (Lavin *et al.*, 2017; Tirosh *et al.*, 2016, Zheng *et al.*, 2017) y la activación de la señalización de CD28 mejora las señales del receptor de linfocitos T, se espera que la combinación de una molécula de TCB con una molécula de CD28 que actúa sobre el tumor actúe sinérgicamente para inducir respuestas antitumorales fuertes y duraderas. Por lo tanto, en la presente se describen moléculas agonistas novedosas de CD28 que actúan sobre el tumor que exhiben sinergia con TCB y que requieren unión monovalente de CD28 para una estricta dependencia de la diana tumoral en presencia de señales de TCB.

Inmunotratamiento de tumores sólidos

El tratamiento de tumores sólidos es un desafío constante, y se vieron pocos avances en los últimos años. En general, el tratamiento es una combinación de cirugía y quimioterapia y/o radioterapia. Si bien últimamente se desarrollaron bastantes modalidades de tratamiento nuevas, aún existe una necesidad de mayores mejoras, para aumentar las tasas de supervivencia de pacientes que padecen tumores sólidos, y para mejorar su calidad de vida. Los tumores sólidos rara vez expresan un antígeno específico del tumor. Para los tumores sólidos es más común hallar un antígeno asociado al tumor (TAA) que se encuentra enriquecido en tumores, pero que se expresa en niveles muy bajos en tejidos normales. Preferentemente, el TAA se presenta en la superficie de la célula del tumor sólido o en una célula del estroma tumoral. Este es el caso de muchos TAA que suelen ser diana para tumores sólidos, incluida la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), el receptor alfa de folato (FolR1), el proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y p95HER2. Otros TAA incluyen HER3, EpCAM, TPBG (5T4), mesotelina, MUC1 y PSMA. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende un dominio de unión al antígeno que se une de manera específica a un antígeno asociado al tumor se dirigirá de este modo principalmente a la superficie del tumor o al microentorno del tumor y activará específicamente los linfocitos T en la proximidad del tumor mientras que se puede evitar una activación sistémica.

Fundamentos para dirigir el agonismo de CD28 a las neoplasias de linfocitos B

El linfoma no hodgkiniano (NHL) es una de las principales causas de muerte por cáncer en los Estados Unidos y en Europa. El linfoma folicular (FL) es de escasa malignidad en su curso y tiene una tasa lenta de evolución, con una mediana de supervivencia de 8 a 10 años; en general, los pacientes en estadio clínico avanzado no tienen cura. Asimismo, en 2 % a 3 % de pacientes por año, el fenotipo de FL se puede transformar en un linfoma agresivo de células grandes, un evento crítico en el curso de la enfermedad que se asocia con una mayor mortalidad relacionada con el linfoma. El linfoma de células del manto y el linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) son más agresivos y, si no se tratan, tienen una tasa media de supervivencia de solo 6 meses. La falta de resultados curativos para muchos pacientes con ambos subtipos de NHL, de escasa malignidad y agresivo, sigue siendo una necesidad médica no cubierta, a pesar de los avances

significativos en los tratamientos inmunitarios que extendieron los tiempos de supervivencia sin progresión. Durante los últimos años se observó una prolongación significativa de la supervivencia en DLBCL, particularmente con la adición del anticuerpo monoclonal anti-CD20, rituximab (Rituxan®, MabThera®) a regímenes quimioterapéuticos citotóxicos intensivos. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento convencional para el DLBCL sin tratamiento previo tiene como propósito ser curativo, la mayoría de los pacientes finalmente tiene una recaída. Asimismo, el FL avanzado sigue siendo en gran medida incurable mediante el SoC actual y se caracteriza por recaídas reiteradas y remisiones progresivamente más breves. Actualmente, muchos anticuerpos monoclonales de nueva generación están en diferentes fases de evaluación preclínicas y clínicas para continuar mejorando el resultado de los pacientes con NHL y superar los mecanismos de resistencia a rituximab. La quimioterapia de dosis alta con soporte autólogo de células madre o trasplante de células madre alogénico proporciona una opción curativa solo para una minoría (10 %) de pacientes con DLBCL recidivante/resistente (r/r) y está asociada con una considerable mortalidad relacionada con el tratamiento. Otros métodos para el tratamiento de NHL actualmente en desarrollo incluyen compuestos que actúan sobre moléculas, como venetoclax e inhibidores de BET. Los agentes novedosos recientemente aprobados incluyen lenalidomida, idelalisib y copanlisib. El tratamiento con linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CAR) se aprobó para el tratamiento de formas agresivas de B-NHL r/r, pero este tratamiento solo está disponible en entornos limitados y puede estar asociado con eventos neurológicos mortales y síndrome de liberación de citocina (CRS). Actualmente, se encuentran en desarrollo constructos de anticuerpos biespecíficos que redirigen la lisis de células citotóxicas a linfocitos B malignos, que mostraron una eficacia muy prometedora contra NHL. Se prevén tratamientos sin quimioterapia para el futuro de NHL y, probablemente, estos se basen en anticuerpos biespecíficos o linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (linfocitos T CAR). Un agonista de CD28 que actúa sobre un antígeno de superficie de linfocitos B en combinación con inmunotratamiento mejorará la tasa de supervivencia y/o curación en pacientes con neoplasias de linfocitos B, sin comprometer la calidad de vida.

Antígenos de superficie de linfocitos B como diana para neoplasias de linfocitos B

Los TAA relacionados con neoplasias de linfocitos B son antígenos de superficie de linfocitos B. El antígeno humano CD19 es una glucoproteína transmembrana 95 KDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. CD19 se clasifica como una proteína transmembrana de tipo I, con un solo dominio transmembrana, un extremo C citoplásmico

y un extremo N extracelular. En células normales, es la proteína expresada de manera más ubicua en el linaje de linfocitos B. La expresión de CD19 se mantiene en las células del linaje de linfocitos B que experimentaron transformación neoplástica y, por lo tanto, CD19 es útil en el diagnóstico de leucemias y linfomas usando anticuerpos monoclonales (mAbs) y citometría de flujo, así como lo es el antígeno CD20. Debido a que las leucemias y linfomas de linaje B rara vez pierden la expresión de CD19, y debido a que no se expresa en las células madre pluripotentes, este se transformó en la diana de diversos agentes inmunoterapéuticos, que incluyen inmunotoxinas. CD79 es el componente de señalización del receptor de linfocitos B que consiste en un heterodímero covalente que contiene CD79a (Igα, mb-1) y CD79b (Igβ, B29). CD79a y CD79b contienen un dominio de inmunoglobulina (Ig) extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular, un dominio con un motivo de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM), como otras proteínas de señalización, tales como CD3 o el receptor Fcγ de activación. Por lo tanto, CD79a y CD79b son proteínas transmembrana que componen las subunidades de señalización del receptor de linfocitos B (BCR). CD79b es una proteína de 39 KDa que se expresa exclusivamente en linfocitos B y, junto con CD79a, inicia la cascada de transducción de señal corriente abajo del BCR, lo que conduce a la internalización del complejo BCR, su translocación a los endosomas y la presentación de antígenos. En linfocitos B, el agrupamiento de BCR inducido por antígenos desencadena la fosforilación de tirosina del ITAM de CD79a y CD79b mediante quinasas Src. Esto conduce al reclutamiento y la activación de un conjunto de moléculas efectoras que pertenecen a la cascada de señalización BCR, incluidas las más notables, SYK y BLNK. Corriente más abajo, el reclutamiento de PLCg2, Btk y ERK facilita el flujo de calcio y activa los linfocitos B, que luego estarán listos para recibir señales de coactivación adicionales que impulsarán su proliferación y diferenciación en células de memoria o efectoras. Durante este proceso, los linfocitos B se vuelven APC robustos y liberan citocinas que pueden influir en el resultado y la calidad de la respuesta inmunitaria. Además de su función en la señalización de BCR, las subunidades CD79 también son esenciales para el transporte y la presentación de Ig unida a la membrana desde el retículo endoplasmático hasta la superficie celular. La expresión superficial promedio de CD79b en NHL es similar a aquella de los linfocitos B normales, pero con un rango más amplio. Dada la expresión de CD79b, es beneficioso producir anticuerpos terapéuticos contra el antígeno CD79b que creen poco o nada de antigenicidad al administrarlos a pacientes, especialmente para tratamientos crónicos.

Se descubrió que se logra una mejor activación de los linfocitos T cuando se combinan

cantidades reducidas de anticuerpos biespecíficos anti-CD3, es decir, anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB), tal como, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico CD20-CD3, con moléculas agonistas anti-CD28. Dado que CD28 se expresa en el inicio en linfocitos T en diversas indicaciones de tumor (Lavin *et al.*, 2017; Tirosh *et al.*, 2016, Zheng *et al.*, 2017) y la activación de la señalización de CD28 mejora las señales del receptor de linfocitos T, se espera que la combinación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T con moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre un antígeno de superficie de linfocitos B actúe sinérgicamente para inducir respuestas antitumorales fuertes y duraderas. Por lo tanto, en la presente se describen moléculas biespecíficas agonistas novedosas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre un antígeno de superficie de linfocitos B que exhiben sinergia con TCB y que requieren unión monovalente de CD28 para una estricta dependencia de la diana tumoral en presencia de señales de TCB.

Inmunotratamiento en mieloma múltiple

El mieloma múltiple (MM) afecta ~75.000 pacientes nuevos cada año en los Estados Unidos de América y Europa y es una de las neoplasias hematológicas más comunes que aún presenta una alta necesidad médica no cubierta. El mieloma múltiple se caracteriza por células plasmáticas terminalmente diferenciadas que secretan inmunoglobulinas monoclonales no funcionales. En el corto plazo, los fármacos inmunomoduladores, tales como lenalidomida y pomalidomida, y los inhibidores de proteosoma, tales como carfilzomib o bortezomib, pueden seguir siendo la estructura principal del tratamiento de primera línea para el mieloma múltiple (Moreau *et al*, 2016). Sin embargo, estos fármacos no actúan de manera específica sobre las células tumorales enfermas, por ejemplo, células plasmáticas enfermas (PC). Se han hecho esfuerzos para disminuir selectivamente las células plasmáticas en el mieloma múltiple. La falta de proteínas de superficie que marquen de manera específica las células plasmáticas obstaculizó el desarrollo de anticuerpos o tratamientos celulares para el mieloma múltiple. Hasta el momento, existen pocos casos de productos biológicos exitosos, que incluyen daratumumab (anti-CD38) y elotuzumab (anti-CD319), con la advertencia de que ambos antígenos también se expresan en otros tejidos normales, que incluyen linajes hematopoyéticos y células efectoras inmunitarias, lo que puede limitar su uso clínico a largo plazo. Un antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA), una glucoproteína transmembrana en la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 17 (TNFRSF17), se expresa a niveles significativamente mayores en las células de MM de todos los pacientes, pero no en otros tejidos normales, excepto en células plasmáticas

normales. Los linfocitos T con receptor de antígeno quimérico (CAR) BCMA ya mostraron actividades clínicas significativas en pacientes con RRMM que realizaron al menos tres tratamientos previos, que incluyen un inhibidor de proteosoma y un agente inmunomodulador. Las modalidades adicionales, que incluyen el conjugado anticuerpo-fármaco anti-BCMA, también lograron respuestas clínicas significativas en pacientes que fracasaron en al menos tres líneas de tratamiento previas, que incluyen un anticuerpo anti-CD38, un inhibidor de proteosoma y un agente inmunomodulador (Cho *et al*, 2018). Un desafío, por ejemplo, del tratamiento que actúa sobre BCMA o CD38 yace en la presencia de niveles altos de BCMA o CD38 soluble en el suero de pacientes que tienen MM, lo que puede reducir la cantidad de fármaco activo en el paciente. Una alternativa puede ser dianas nuevas, tal como el receptor acoplado a la proteína G de clase C, grupo 5, miembro D (GPRC5D), que se expresa de manera diferenciada mediante células plasmáticas en mieloma múltiple en comparación con células plasmáticas de donantes sanos, y no tiene forma soluble. Se informó que GPRC5D se asocia con pronóstico y carga tumoral en pacientes con mieloma múltiple (Atamaniuk, J. *et al.*, 2012; y Cohen, Y., *et al.*, 2013). GPRC5D es un receptor huérfano sin ligando(s) conocido(s) y biología mayormente desconocida en hombres en términos generales y en cáncer en términos específicos. El gen que codifica GPRC5D, que se encuentra mapeado en el cromosoma 12p13.3, contiene tres exones y abarca alrededor de 9,6 kb (Brauner-Osborne, H. *et al.* 2001). El primer exón grande codifica los siete dominios transmembrana. Se ha demostrado que GPRC5D está involucrado en la formación de queratina en folículos pilosos en animales (Gao, Y. *et al.*, 2016, y Inoue, S. *et al.*, 2004). WO 2018/017786 A2 divulga anticuerpos específicos de GPRC5D o fragmentos de unión al antígeno.

Fundamentos para dirigir el agonismo de CD28 a células plasmáticas enfermas en mieloma múltiple

El agonismo de CD28 en el mieloma múltiple puede ejercer diferentes funciones biológicas en las respectivas células plasmáticas de MM inmunitarias. Si bien se espera que la coactivación de linfocitos T mediante CD28 impulse respuestas antitumorales, el agonismo de CD28 en células de MM media la señalización prosupervivencia mediante la regulación de PI3K/Akt, FoxO3a y Bimm que, a su vez, induce la resistencia quimioterapéutica en el mieloma múltiple (Murray M.E. *et al*, 2014). La sobreexpresión de CD28 en células plasmáticas de mieloma múltiple recientemente diagnosticadas se correlaciona con el peor resultado clínico (Bahlis *et al.*, 2007). Sin embargo, si bien la activación de CD28 mejora la supervivencia de las células de mieloma, su activación inhibe la proliferación de las células de mieloma. El agonizador de CD28 en presencia de

una respuesta fuerte mediada por células inmunitarias, tal como una activación biespecífica de linfocitos T de los linfocitos T, puede reforzar aun más las respuestas antitumorales eficaces. En la presente se proporcionan moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que se unen de manera específica a un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM) humano. Particularmente, las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención que actúan sobre los TAA seleccionados de BCMA, CD38 y GPRC5D y CD28 expresados en linfocitos T tienen el potencial de tratar el mieloma múltiple como agente único o en combinación con otros agentes tales como anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) que actúan sobre un antígeno de superficie celular de MM humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre el tumor que logran una activación de linfocitos T dependiente del tumor y la inactivación de células tumorales sin la necesidad de formar multímeros. Las moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 de la presente invención se caracterizan por unirse de manera monovalente a CD28 y en que comprenden al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor (tal como una proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA), CD19 o GPRC5D). Además, poseen un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora. De este modo, la reticulación mediada por un receptor Fc se anula y la activación específica del tumor se logra mediante reticulación a través de la unión del al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor con su antígeno.

Por lo tanto, la invención proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28, que comprende

(a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de

lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se define a continuación, en donde el dominio Fc es una IgG, en particular, un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En un aspecto particular, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable es un dominio Fc de IgG1. En un aspecto, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, el dominio Fc es de subclase IgG1 humana y comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a

CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25.

Además, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:61.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno carcinoembrionario (CEA).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:188, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:189, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:190, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:191, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:192, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:193, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:180, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:181, y una CDR-H3 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:182, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:183, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:184, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:128, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:130, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:131, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132, o

(iv) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:507, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:508, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:509, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:510, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:511, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:512.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:134. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno

CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:194 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:195, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:196 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:197, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:198 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:199, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:202 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:203, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:204 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:212 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213.

Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a la proteína de activación de fibroplastos (FAP). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En un aspecto, se proporciona una

molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a la molécula de adhesión a la célula epitelial (EpCAM). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:515, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:516, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:517, y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:518, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:519, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:520. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521, y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521 y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:523, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:524, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:525, y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:526, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:527, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:528. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529, y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529 y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530.

Aun en otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera

específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:531, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:532, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:533, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:534, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:535, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:536. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538.

Además, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:539, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:540, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:541, y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:542, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:543, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:544. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545, y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545 y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28, que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno de superficie celular del mieloma múltiple (MM), y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora. En un aspecto, el antígeno de superficie celular del mieloma múltiple (MM) seleccionado del grupo que consiste en CD38, BCMA y GPRC5D.

Por lo tanto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:563, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:564, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:565, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:566, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:567, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:568, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:579, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:580, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:581, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:582, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:583, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:584. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:547, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:548, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:549, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:550, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:551, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:552.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al BCMA. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:555, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:556, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:557, y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:558, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:559, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:560. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:559, y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:560. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:561 y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:562.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28, que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno de superficie de linfocitos B, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora. En un aspecto, el antígeno de superficie de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD79b, CD20, CD22 y CD37.

Por lo tanto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:406, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:407, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:408, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:409, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:410, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:411, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:414, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:415, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:416, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:417, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:418, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:419. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende

una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:420, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:421. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:422, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:423, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:424, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:425, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:426, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:427. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429. Particularmente, el dominio de unión al

antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 es un fragmento Fab o un fragmento crossFab.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N

de una de las subunidades del dominio Fc.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se divulga en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del domino Fc, y el tercer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un dominio VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en donde uno de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusionan mediante un ligador peptídico al extremo C de la primera subunidad

del dominio Fc y el otro de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona mediante un ligador peptídico al extremo C de la segunda subunidad del dominio Fc.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan uno o más polinucleótidos aislados que codifican la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención. La invención también proporciona uno o más vectores, en particular, vector(es) de expresión que comprende(n) los polinucleótidos aislados de la invención, y una célula huésped que comprende el/los polinucleótido(s) aislado(s) o el/los vector(es) de expresión de la invención. En algunos aspectos, la célula huésped es una célula eucariota, particularmente, una célula de mamífero. En otro aspecto, se proporciona un método para producir una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. Opcionalmente, el método también comprende recuperar la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. La invención también abarca una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 producida mediante el método de la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención y al menos un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En un aspecto, la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento del cáncer.

Asimismo, la invención abarca métodos de uso de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 y la composición farmacéutica de la invención. En un aspecto, la invención proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente para su uso en (a) la mejora de la activación celular o (b) la mejora de las funciones efectoras de los linfocitos T. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto específico, la enfermedad es cáncer. En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se

administra en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer. En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se administra en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T. Aun en otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se administra en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

Asimismo, se proporciona el uso de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad; así como un método de tratar una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En un aspecto específico, la enfermedad es cáncer. En un aspecto, se proporciona un método para (a) mejorar la activación celular o (b) mejorar las funciones efectoras de los linfocitos T en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En otro aspecto, se proporciona el uso de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en donde el tratamiento comprende la coadministración con un agente quimioterapéutico, radioterapia y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer. En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde el método comprende la coadministración con un agente quimioterapéutico, radioterapia y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento

contra el cáncer. En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde el método comprende la coadministración de un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T. En otro aspecto, se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un individuo, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde el método comprende la coadministración de un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1. Asimismo, se proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención, o una composición que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al anticuerpo CD28 de acuerdo con la invención en una forma aceptable desde el punto de vista farmacéutico, para inhibir el crecimiento de las células tumorales. En cualquiera de los aspectos anteriores, el individuo es, preferentemente, un mamífero, particularmente, un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

En las **figuras 1A a 1L** se muestran ilustraciones esquemáticas de las moléculas como se describen. La **figura 1A** muestra el anticuerpo agonista CD28 CD28(SA) en su isoforma huIgG4 (TGN1412).

La **figura 1B** ilustra el anticuerpo agonista contra CD28(SA) como isotipo hu IgG1 PGLALA (“Fc silencioso”).

Las moléculas biespecíficas de unión al antígeno FAP-CD28 en formato 1+1, formato 1+2, formato 2+2 y formato 1+4 se muestran en las **figuras 1C, 1D, 1E** y **1F**, respectivamente.

Las moléculas biespecíficas de unión al antígeno CEA-CD28 en formato 1+2, formato 2+2 y formato 1+1 se muestran en las **figuras 1G, 1H** y **1J**, respectivamente.

La **figura 1I** muestra una ilustración esquemática de las variantes del anticuerpo agonista contra CD28 como isotipo monovalente hu IgG1 PGLALA (“Fc silencioso”).

La **figura 1K** muestra una molécula biespecífica de unión al antígeno FAP-CD28 en formato 1+1, en donde el dominio de unión al antígeno FAP se representa como los dominios VH y VL cada uno fusionado a un extremo C de las subunidades del dominio Fc.

La **figura 1L** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno FAP-CD28 en formato 2+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab que se fusiona en su extremo C al extremo N de una de las cadenas pesadas del anticuerpo contra FAP “bivalente”.

La **figura 1M** muestra otra molécula biespecífica de unión al antígeno FAP-CD28 en formato 1+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab que se fusiona en su extremo C al extremo N del fragmento Fab que se une a FAP.

La **figura 1N** ilustra una molécula triespecífica de unión al antígeno FAP-CEA-CD28 en formato 1+1+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como Fab que se fusiona en su extremo C tanto de la cadena liviana como de la cadena pesada al extremo N tanto de la cadena liviana como de la cadena pesada del dominio de unión al antígeno anti-FAP en la cadena de botones de huIgG1 PG-LALA Fc y en donde el fragmento de CrossFab anti-CEA es parte de la cadena de ojales huIgG1 PG-LALA Fc.

Las **figuras 2A, 2B, 2C, 2D** y **2E** se refieren a la unión de los anticuerpos agonistas contra CD28 y las moléculas de unión al antígeno FAP-CD28 a CD28 humano o FAP humana en las células. Se muestra la unión de CD28(SA) en su isoforma IgG4 en comparación con el isotipo hu IgG1 PGLALA a CD28 humana en la **figura 2A** y la unión de diferentes moléculas FAP-CD28 a CD28 humano (**figura 2B**) y FAP humana (**figura 2C**) en células. Se evaluaron mediante citometría de flujo las intensidades de fluorescencia media de la unión de diferentes anticuerpos agonistas contra CD28 o moléculas que actúan sobre anti-DP47 a células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) o células 3T3 que expresan FAP humana (línea celular NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)). Se representan triplicados técnicos con SEM. Una comparación de moléculas de unión al antígeno FAP(4B9)-CD28(SA) (moléculas D, E y F como se describe en el ejemplo 1) se muestra en la **figura 2D** (con unión a CD28 humano) y la **figura 2E** (con unión a FAP humana).

Las **figuras 2F** y **2G** muestran la unión de diferentes formatos de moléculas de unión al antígeno FAP-CD28 con unión monovalente a CD28 y FAP, respectivamente. Se muestran las curvas para FAP-CD28 CTF 1+1 (P1AE2236, molécula I), FAP-CD28 1+1 (P1AD4492, molécula C), FAP-CD28 H2T 1+1 (P1AE2021, molécula H) y los dos compuestos FAP-CD28(SA) 1+2 (P1AD9011, molécula E) y DP47 como referencia. Se muestran las intensidades de fluorescencia media de la unión de los anticuerpos contra FAP-CD28 o anticuerpo anti-DP47 (control negativo) a células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) (**figura 2F**) o células 3T3 que expresan FAP humana (línea celular NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)) (**figura 2G**), evaluadas mediante citometría de flujo. Se muestran triplicados técnicos con SEM. Las **figuras 2H** y **2I** muestran la unión de FAP-CD28 2+1 (P1AE5231, molécula G) a CD28 y FAP, respectivamente.

La alineación de los dominios variables de CD28(SA) y sus variantes se muestra en las **figuras 3A** a **3D**. La alineación del dominio VH de CD28(SA) y sus variantes para remover cisteína 50 y para reducir la afinidad de los aglutinantes anti-CD28 resultantes hasta diferentes grados se muestra en las **figuras 3A** y **3B**. Cabe destacar que, en las variantes de VH i y j, las CDR de CD28(SA) se injertaron de una estructura IGHV1-2 en una estructura IGHV3-23 (**figura 3B**). En las **figuras 3C** y **3D** se muestra la alineación del dominio VL de CD28(SA) y sus variantes para reducir la afinidad de los aglutinantes anti-CD28 resultantes hasta diferentes grados. En la variante t, las CDR se injertaron en la secuencia estructural de la secuencia de VL de trastuzumab (Herceptin).

En las **figuras 4A** a **4C** se muestra la unión de las variantes de anticuerpo agonista contra CD28 de afinidad reducida en formatos de IgG monoespecífica monovalente de sobrenadantes a CD28 humano en células. Se evaluaron mediante citometría de flujo las intensidades de fluorescencia media de la unión a células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) en comparación con el control negativo (anti-DP47) y el TGN1412 original. Las curvas de unión de las variantes 1 a 10 se muestran en la **figura 4A**, aquellas de las variantes 11 a 22 en la **figura 4B** y aquellas de las variantes 23 a 31 en la **figura 4C**. Se representan duplicados técnicos con SD.

En las **figuras 4D** y **4E** se muestra la unión de las variantes de anticuerpo agonista biespecífico contra CD28 que actúa sobre FAP en formato huIgG1 PG-LALA 1+1 con variantes seleccionadas de anticuerpo agonista contra CD28 de afinidad reducida a CD28 humano en células. Las curvas de unión de los constructos biespecíficos 1+1 con las

variantes 8, 11, 12, 15, 16 y 17 se muestran en la **figura 4D**, mientras que las curvas de unión de los constructos biespecíficos 1+1 con las variantes 19, 23, 25, 27 y 29 se muestran en la **figura 4E**. Se eligieron aglutinantes seleccionados en función de las afinidades para la producción en un formato biespecífico 1+1 que actúa sobre FAP. En las **figuras 4F** y **4G** se muestra la unión de las mismas variantes de anticuerpo agonista biespecífico contra CD28 que actúa sobre FAP en formato huIgG1 PG-LALA 1+1 a FAP humana. Se proporcionan intensidades de fluorescencia media de la unión a células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) o a células 3T3 que expresan FAP humana (línea celular NIH/3T3 (ATCC CRL-1658)) en comparación con el control negativo (anti-DP47) y con TGN1412 (molécula A), evaluadas mediante citometría de flujo. Se muestran triplicados técnicos con SEM.

La potencia *in vitro* de las variantes seleccionadas de anticuerpo agonista biespecífico contra CD28 que actúa sobre FAP en formato huIgG1 PG-LALA 1+1 se ilustra en las **figuras 4H**, **4I** y **4J**. Los linfocitos T de las PBMC se incubaron con células de melanoma MV3 que expresan MCSP y FAP durante 5 días en presencia de concentración limitante de MCSP-TCB (5 pM, P1AD2189) y concentración en aumento de constructos FAP-CD28 con los aglutinantes indicados de variante de CD28. En la **figura 4H** se muestra la dilución de CFSE como medida para la proliferación de linfocitos T de linfocitos T CD8, evaluada mediante citometría de flujo. Las barras de error muestran el SEM, los gráficos representan triplicados técnicos de resultados representativos de 2 donantes. En la **figura 4I** se muestra la correlación de K_D (nM) de la variante del aglutinante de CD28 con respecto a la potencia por área bajo la curva de (a) como % del clon TGN1412 de origen (CD28(SA)). En la **figura 4J** se muestra la inactivación de células diana a 90 h.

Las **figuras 5A** a **5D** se refieren al establecimiento del precultivo de alta densidad (HD) y modo de acción de CD28(SA). Los linfocitos T de las PBMC se cultivaron previamente a alta densidad (HD) durante 2 días o se usaron nuevos a partir del aislamiento de PBMC y se estimularon con concentraciones en aumento de CD28(SA). Se representa la dilución de CFSE como representante para la proliferación de linfocitos T después de 5 días de estimulación con CD28(SA) (molécula A, P1AE1975) (**figura 5A**) y secreción de citocina después de 2 días (**figura 5B**) de estimulación. La **figura 5C** muestra el porcentaje de la expresión de FcγRIIb en monocitos de PBMC y linfocitos B antes y después de 2 días del precultivo de PBMC de HD, evaluado mediante citometría de flujo. **Figura 5D**: Las PBMC cultivadas previamente de HD se cocultivaron con CD28(SA) durante 5 días en presencia o ausencia de un anticuerpo de bloqueo de FcγRIIb o control de isotipo, y el porcentaje

de dilución de CFSE de linfocitos T CD4 se evaluó mediante citometría de flujo. Los gráficos representan al menos 6 donantes (**figura 5A, 5B**) y 2 donantes (**figura 5C, 5D**), cada uno evaluado en experimentos independientes. Los gráficos muestran triplicados técnicos. Las barras de error indican SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba t de Student. ***: p<0,001. El superagonismo de CD28(SA) IgG4 depende de la reticulación a FcγRIIb.

En las **figuras 6A** y **6B** se muestra la proliferación de linfocitos T, es decir, la dilución de CFSE de linfocitos T CD4 después de 5 días de estimulación con IgG4 CD28(SA) de tipo silvestre Fc original (*P1AE1975*) o CD28(SA) que tiene la mutación P329G-LALA (*P1AD9289*). Los linfocitos T se cultivaron previamente a alta densidad durante 2 días. Los gráficos representan al menos 3 experimentos independientes. Se muestran los triplicados técnicos. El silenciamiento de Fc elimina el superagonismo en TGN1412. La adición de una porción que actúa sobre el tumor a TGN1412 de Fc silenciosa restaura el superagonismo, que, en consecuencia, depende de la presencia de la diana tumoral.

En las **figuras 7A, 7B, 7C** y **7D** se muestra una comparación de agonistas de CD28 que actúan sobre FAP en diferentes formatos (2+2 y 1+2) y con aglutinantes superagonistas (CD28(SA)) y aglutinantes agonistas convencionales (9.3, CD28(CA)). Los agonistas de CD28 que actúan sobre FAP con aglutinantes agonistas de CD28 convencionales no funcionan como superagonistas. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron con células 3T3-huFAP (FAP presente) en presencia de concentraciones en aumento de los formatos FAP-CD28 con aglutinantes superagonistas (SA, **figura 7A**) o aglutinantes agonistas convencionales (9.3, **figura 7B**) durante 5 días. Se muestra la proliferación de linfocitos T. Luego, los linfocitos T de las PBMC también se cocultivaron con células 3T3 WT (FAP ausente) en presencia de concentraciones en aumento de los formatos FAP-CD28 con aglutinantes superagonistas (SA, **figura 7C**) o aglutinantes agonistas convencionales (9.3, **figura 7D**) durante 5 días. Se representa la dilución de CFSE como medida para la proliferación de linfocitos T de linfocitos T CD8, evaluada mediante citometría de flujo el día 5 después de la estimulación. Los gráficos muestran datos acumulativos de 3 donantes en 3 experimentos independientes. Las barras de error muestran SEM. En la misma configuración experimental también se midieron las citocinas a partir de sobrenadantes después de 2 días del cocultivo. Los valores se proporcionan en la **figura 7E**.

La capacidad de FAP-CD28 en diversos formatos con aglutinantes superagonistas CD28(SA) o aglutinantes agonistas convencionales (CD28(CA)) para inducir la

inactivación de células de melanoma RFP-MV3 que expresan FAP se evaluó durante 90 h mediante imágenes de células vivas usando la tecnología IncuCyte. Todas las moléculas que incluyen el FAP-TCB (P1AD4645) se usaron a 10 nM. Las **figuras 8A, 8B** y **8C** muestran resultados representativos de tres donantes con triplicados técnicos, respectivamente. La **figura 8D** muestra los resultados acumulativos expresados como área bajo la curva (AUC) a t=90 h de 3 donantes de 3 experimentos independientes. Las cajas presentan los 25.° a 75.° percentiles, los bigotes presentan mínimo a máximo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA pareada de un factor. ***: p<0,001, ns: no significativo.

Una comparación de agonistas de CD28 que actúan sobre CEA en diferentes formatos con aglutinantes agonistas convencionales y superagonistas se muestra en las **figuras 9A** y **9B**. La capacidad de CEA-CD28 en diversos formatos con aglutinantes superagonistas de CD28(SA) o aglutinantes agonistas convencionales (CD28(CA)) para inducir la inactivación de células de cáncer gástrico RFP^+ MKN45 que expresan CEA se evaluó durante 90 h mediante imágenes de células vivas usando la tecnología IncuCyte. Todas las moléculas que incluyen el CEACAM5-TCB (P1AD5299) se usaron a 10 nM. La **figura 9A** muestra resultados representativos de un donante con triplicados técnicos. La **figura 9B** muestra el análisis estadístico de triplicados técnicos expresados como área bajo la curva (AUC) a t=90 h de 1 donante en 1 experimento. Las cajas presentan los 25.° a 75.° percentiles, los bigotes presentan mínimo a máximo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA pareada de un factor. ***: p<0,001. Se muestra que los agonistas de CD28 que actúan sobre CEA con aglutinantes agonistas de CD28 convencionales no se comportan de manera superagonista.

En las **figuras 10A, 10B** y **10C** se muestra que los agonistas de CD28 diana con aglutinantes superagonistas monovalentes no funcionan como superagonistas. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron durante 5 días con células 3T3-huFAP en presencia de concentraciones en aumento de FAP-CD28 con aglutinantes de CD28 bivalentes (P1AD9011, círculos cerrados) o FAP-CD28 con monovalencia para la unión de CD28 (P1AD4492, círculos abiertos). En la **figura 10A** se muestra la dilución de CFSE de linfocitos T CD8. Además, la activación de linfocitos T se evaluó mediante la detección de los marcadores de activación CD69 (**figura 10B**) y CD25 (**figura 10C**) mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de la tinción de CD69 y CD25 se muestra 5 días después de la estimulación. Se muestran triplicados técnicos de 1 donante, las barras de error indican SEM. Se muestra que el superagonismo tipo TGN1412 requiere la unión de CD28 multivalente.

Las **figuras 11A** y **11B** muestran que si se combinan con los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB), las funciones efectoras mediadas por TCB se soportan mediante la unión de CD28 monovalente y bivalente de moléculas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre FAP con potencia comparable, pero la monovalencia del aglutinante de CD28 se requiere para mantener la dependencia de la diana tumoral de los agonistas de CD28 en presencia de los TCB. En la **figura 11A**, para la presencia de FAP, los linfocitos T de las PBMC se incubaron con células de melanoma MV3 que expresan MCSP y FAP durante 90 h en presencia de una concentración limitante combinada de MCSP-TCB (5 pM, *P1AD2189*) y una concentración en aumento (rango 0-10 nM) de FAP-CD28(SA) con unión a CD28 bivalente o monovalente, respectivamente. Se representa la inactivación de células diana a 90 h según la evaluación mediante imágenes de células vivas usando la tecnología IncuCyte. En la **figura 11B**, los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron durante 90 h con células de cáncer gástrico MKN45 que expresan CEA negativas para FAP (FAP ausente) en presencia de concentraciones limitantes de CEACAM5-TCB (10 pM, *P1AD5299*) en combinación y una concentración limitante (rango 0-10 nM) de FAP-CD28 con unión de CD28 bivalente o monovalente, respectivamente. Se representa la inactivación de células diana a 90 h según la evaluación mediante IncuCyte. Los datos muestran la inactivación de células diana MKN45 en el tiempo, de 1 donante en 1 experimento, triplicados técnicos, las barras de error indican SEM.

En las **figuras 12A** y **12B** se muestra que FAP-CD28(SA) con unión bivalente a CD28 pierde la dependencia de FAP cuando está combinado con los biespecíficos de linfocitos T. En la **figura 12A** no está presente ningún TCB. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron con MKN45 que expresa CEA y 3T3-huFAP (condición “FAP presente”, círculos cerrados) o 3T3-WT (condición “FAP ausente”, círculos abiertos), respectivamente, en presencia de concentraciones en aumento de FAP-CD28(SA) 2+1. La combinación con TCB se muestra en la **figura 12B**. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron con MKN45 que expresa CEA y 3T3-huFAP (condición “FAP presente”, círculos cerrados) o 3T3-WT (condición “FAP ausente”, círculos abiertos), respectivamente, en presencia de concentraciones limitantes de CEACAM5-TCB (10 pM, *P1AD5299*) y concentraciones en aumento de FAP-CD28 2+1 SA. Se muestra la proliferación de linfocitos T CD8 después de 5 días de estimulación. Los datos representan 2 experimentos independientes con 2 donantes. Los resultados de un donante se muestran, los puntos de datos representan triplicados técnicos, las barras de error indican SEM.

Las **figuras 13A, 13B** y **13C** muestran la funcionalidad de las moléculas de unión al antígeno FAP-CD28(SA) con unión monovalente a CD28 en diferentes formatos. La molécula C es un formato 1+1 clásico FAP-CD28(SA)(P1AD4492), la molécula H es un formato “cabeza a cola” (H2T) 1+1 FAP-CD28(SA) (P1AE2021), la molécula I es un formato 1+1 FAP-CD28(SA) con fusión del extremo C del aglutinante de FAP (P1AE2236) y la molécula G es un formato 2+1 FAP-CD28(SA) (P1AD5231). Como referencia, se usó la molécula de unión al antígeno CD28 bivalente (P1AD9011). Los linfocitos T de las PBMC se incubaron con células de melanoma MV3 que expresan MCSP y FAP en presencia de concentración limitante de MCSP-TCB (5 pM, *P1AD2189*) y concentración en aumento (rango 0-10 nM) de FAP-CD28 en los formatos determinados. Se representa la dilución de CFSE como medida para la proliferación de linfocitos T CD8 (**figura 13A**) y linfocitos T CD4 (**figura 13B**) después de 5 días, evaluada mediante citometría de flujo. **Figura 13C**: Se muestra la inactivación de las células MV3 durante 84 horas en presencia de 5 pM de MCSP-TCB solo en comparación con la combinación de 5 pM de MCSP-TCB y concentraciones en aumento de FAP-CD28 en los diversos formatos. La inactivación se evaluó mediante imágenes de células vivas usando el sistema IncuCyte. Todas las moléculas pudieron soportar las funciones efectoras mediadas por TCB. Los gráficos representan datos acumulativos de 3 experimentos independientes y 4 donantes, 10 pM de MCSP-TCB; E:T 20; Estadísticas: ANOVA de dos factores. Los asteriscos indican la menor concentración a la cual el complemento es significativo en comparación con TCB solo: *p≤0,05, **p≤0,01; ***p≤0,001. Las barras de error indican SEM.

La inactivación de células diana de formato 1+1 CEA-CD28 en combinación con TCB se muestra en la **figura 14**. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron durante 90 h con células de cáncer gástrico MKN45 que expresan CEA en presencia de concentraciones limitantes de CEACAM5-TCB (10 pM, *P1AD5299*) en combinación con 2 nM de CEA-CD28 (*P1AE3127*) o CD28 no diana (*P1AD8944*). Los datos muestran la inactivación de células diana MKN45 en el tiempo, de 1 donante en 1 experimento. La inactivación se evaluó mediante imágenes de células vivas usando el sistema IncuCyte. Se muestra que solamente la combinación provoca la inactivación de células diana, a la concentración determinada, las moléculas solas no inducen la inactivación. CEA-CD28 actúa en sinergia con CEACAM5-TCB.

En la **figura 15** se muestra que CEA-CD28 mejora CEA-TCB y CEACAM5-TCB y disminuye el umbral de expresión de CEA para que los TCB induzcan la activación de linfocitos T. Los linfocitos T de las PBMC se incubaron con concentraciones en aumento de CEA-TCB (*P1AD4646*) o CEACAM5-TCB (*P1AD5299*) y concentraciones fijas de

CEA-CD28 (*P1AE3127*) en presencia de líneas celulares diana con diferentes niveles de expresión de CEA: (i) MKN45 (expresión alta, aproximadamente 400.000 sitios de unión CEA/célula), (ii) Lovo (expresión media, aproximadamente 60.000 sitios de unión CEA/célula), (iii) HT-29 (expresión baja, aproximadamente 6.000 sitios de unión CEA/célula). La proliferación de linfocitos T se evaluó como representante de la activación de linfocitos T mediante citometría de flujo.

La unión de las variantes del aglutinante de CD28 de afinidad reducida seleccionadas en un formato 1+1 monovalente que actúa sobre CEA biespecífico a CD28 en células se muestra en la **figura 16**. Las intensidades de fluorescencia media de unión de los anticuerpos contra CEA-CD28 o del anticuerpo anti-DP47 (control negativo) a células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) se evaluaron mediante citometría de flujo. Se muestran triplicados técnicos con SEM.

Las **figuras 17A, 17B** y **17C** muestran la funcionalidad de las variantes del aglutinante de CD28 de afinidad reducida seleccionadas en un formato 1+1 monovalente que actúa sobre CEA biespecífico. Los linfocitos T de las PBMC se cocultivaron con células de cáncer gástrico MKN45 que expresan CEA en presencia de concentraciones limitantes de CEACAM5-TCB (10 pM, *P1AD5299*) en combinación con 2 nM de las moléculas CEA-CD28 1+1 con las variantes del aglutinante de CD28. La proliferación de linfocitos T CD8 (**figura 17A**) y la proliferación de linfocitos T CD4 (**figura 17B**) se evaluaron mediante dilución de CFSE mediante citometría de flujo después de 5 días de cocultivo. La inactivación de células diana se evaluó después de 90 h de incubación (**figura 17C**). Los datos muestran la inactivación de células diana MKN45 en el tiempo, de 1 donante en 1 experimento. Todas las moléculas son capaces de soportar las funciones efectoras mediadas por CEACAM5-TCB.

La **figura 18** muestra la unión de las variantes de CEA humanizado (A5B7) huIgG1 P329G LALA a MKN-45 en comparación con la unión del anticuerpo contra A5B7 murino de origen. Los anticuerpos se detectaron con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, y la fluorescencia se midió mediante citometría de flujo.

Las **figuras 19A** a **19C** son ilustraciones esquemáticas de las proteínas recombinantes que presentan diferentes dominios de la proteína CEACAM5 que se usaron como antígenos en la campaña de expresión en fago. La **figura 19A** muestra el constructo NABA-avi-His que consiste en los 4 dominios de tipo Ig N, A1, B y A2. La **figura 19B**

muestra el constructo N(A2B2)A-avi-His y la figura 19C ilustra el constructo NA(B2)A-avi-His.

Las **figuras 20A** y **20B** muestran las secuencias de VH y VL, respectivamente, del anticuerpo contra CEA humanizado A5H1EL1D en donde las posiciones aleatorizadas se indican con X.

Los dibujos esquemáticos de los vectores de fago de las colecciones de maduración por afinidad se muestran en la **figura 21A** (colección de maduración por afinidad CDRH1/H2), **figura 21B** (colección de maduración por afinidad CDRL1/H2**)** y **figura 21C** (colección de amplificación CDRH3/CDRL3).

Las **figuras 22A** y **22B** muestran una alineación de las secuencias de aminoácidos de VH (**figura 22A**) y secuencia de aminoácidos de VL (**figura 22B**) de las variantes de anticuerpo contra CEA(A5H1EL1D) humanizado madurado por afinidad.

En las **figuras 23A** a **23D** se muestran ilustraciones esquemáticas de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CEA/CD28 como se describe en el ejemplo 11.

La **figura 23A** muestra una molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28 en formato 1+1, en donde el dominio de unión al antígeno CEA se representa como crossFab (intercambio VH/VL) y en el fragmento Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 hay modificaciones cargadas para soportar el apareamiento correcto de las cadenas livianas. El dominio Fc tiene modificaciones de botón en ojal y las mutaciones P329G LALA para anular la unión a los receptores Fcγ. En la **figura 23B** se representa el dominio de unión al antígeno CD28 como crossFab (intercambio VH/VL) y el fragmento Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CEA comprende las modificaciones cargadas.

La **figura 23C** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28 en formato 2+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab y dos fragmentos Fab con los dominios de unión al antígeno CEA se fusionan entre sí mediante la cadena pesada (cabeza a cola).

La **figura 23D** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28 en formato 2+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab que se fusiona en su extremo C al extremo N de una de las cadenas pesadas del anticuerpo contra CEA “bivalente” (formato “clásico”).

En la **figura 24** se muestra que el clon P002.139 anti-CEA madurado por afinidad muestra una mejor unión a CEACAM5 en células MV3 que expresan CEA. Se muestra la unión de anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 que tienen el clon P002.139 anti-CEA madurado por afinidad o el clon A5H1EL1D de origen. Las intensidades de fluorescencia media de la unión de los anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 o anticuerpo anti-DP47 (control negativo) a células MV3 modificadas por ingeniería genética para expresar CEACAM5 humano se evaluaron mediante citometría de flujo. Se muestran los duplicados técnicos con SEM. El gráfico representa 3 experimentos independientes.

En las **figuras 25A** y **25B** se muestra que el clon P002.139 anti-CEA madurado por afinidad presenta una mejor funcionalidad en un ensayo indicador de IL-2. Se muestra la lectura de luminiscencia después de 6 h de coincubación de las células MKN45, células indicadoras de IL-2 con 5 nM de CEA-TCB y CEA-CD28 que tienen el clon P002.139 madurado por afinidad o el clon A5H1EL1D de origen. La **figura 25A** muestra la respuesta a la dosis. Las líneas punteadas indican la luminiscencia alcanzada por CEA-TCB solo. En la **figura 25B** se muestran los valores de área bajo la curva calculados a partir de los datos representados en la **figura 25A**. Se proporcionan los duplicados técnicos con SEM. El gráfico representa 3 experimentos independientes.

La **figura 26** muestra el diseño del estudio de un estudio de eficacia con anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 (comparación de diferentes clones de CEA) en combinación con CEA TCB en xenoinjerto de MKN45 en ratones humanizados. Se muestra el diseño y los diferentes grupos de tratamiento.

Las **figuras 27A a 27E** muestran los resultados del estudio de eficacia con la combinación de CEA-CD28 y CEA TCB en xenoinjerto de MKN45 en ratones humanizados. Se muestra el volumen tumoral promedio (**figura 27A**) o el crecimiento de los tumores en ratones individuales para los cuatro grupos de tratamiento como se representa en el eje y (**figura 27B a 27E**). La **figura 27B** muestra el crecimiento del tumor para cada ratón individual en el grupo de vehículo, la **figura 27C** de los ratones tratados con CEA TCB solo, la **figura 27D** de los ratones tratados con CEA TCB y CEA(T84.66)-CD28 (SA_Variante 15) y la **figura 27E** de los ratones tratados con CEA TCB y CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15). Se puede observar que existe una mayor regresión tumoral mediada por TCB en presencia de ambos anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28.

La **figura 28** muestra el diseño del estudio de un estudio de eficacia con anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 (comparación de diferentes clones de CD28) en combinación con CEACAM5 TCB en xenoinjerto de BXPC3 en ratones humanizados. Se muestra el diseño y los diferentes grupos de tratamiento.

La **figura 29** muestra la cinética del crecimiento del tumor (Media, +SEM) para todos los grupos de tratamiento, los valores de TGI correspondientes de cada grupo de tratamiento se muestran en la tabla 33 (ejemplo 13.2).

Los datos de Inmuno-PD *ex vivo* se muestran en las **figuras 30A** a **30D**. La **figura 30A** muestra gráficos de puntos representativos (CD3 contra CD45 y CD4 contra CD8) de las suspensiones de célula única tumoral teñida de cada grupo de tratamiento. El resumen de la infiltración de linfocitos T CD3, CD8 y CD4 se representa en la **figura 30B** (CD3), **figura 30C (**CD8) y **figura 30D** (CD4), respectivamente.

La **figura 31** muestra el diseño del estudio de un estudio de eficacia con anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 (CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8)) en combinación con CEA TCB en xenoinjerto de MKN45 en ratones humanizados. Se muestra el diseño y los diferentes grupos de tratamiento.

La **figura 32** muestra la cinética del crecimiento del tumor (Media, +SEM) para todos los grupos de tratamiento, los valores de TGI correspondientes de cada grupo de tratamiento se muestran en la tabla 35 (ejemplo 13.3).

Los datos de Inmuno-PD *ex vivo* se muestran en las **figuras 33A** y **33B**. La **figura 33A** muestra gráficos de puntos representativos de las suspensiones de célula única tumoral teñida de cada grupo de tratamiento. La síntesis de la infiltración de los linfocitos T CD3+ se ilustra en la **figura 33B**.

En las **figuras 34A** a **34D** se muestran ilustraciones esquemáticas de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 como se describe en el ejemplo 14.

La **figura 34A** muestra una molécula biespecífica de unión al antígeno EpCAM-CD28 en formato 1+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab (intercambio VH/VL) y en el fragmento Fab que tiene el dominio de unión al antígeno EpCAM hay modificaciones cargadas para soportar el apareamiento correcto de las cadenas livianas. El dominio Fc tiene modificaciones de botón en ojal y las mutaciones P329G LALA para anular la unión a los receptores Fcγ.

En la **figura 34B**, el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 comprende modificaciones cargadas y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno HER3 se representa como crossFab (intercambio VH/VL).

La **figura 34C** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno CD30-CD28 en formato 1+1, en donde la molécula de Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 comprende modificaciones cargadas y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD30 se representa como crossFab (intercambio VH/VL).

La **figura 34D** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno TPBG-CD28 en formato 1+1, en donde la molécula de Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 comprende modificaciones cargadas y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno TPBG (5T4) se representa como crossFab (intercambio VH/VL).

Las **figuras 35A** a **35C** se refieren a la caracterización funcional de moléculas biespecíficas de unión al antígeno EpCAM-CD28. En la **figura 35A** se muestra que EpCAM-CD28 (molécula 14A) se une a CD28 humano en células CHO-k1 que expresan CD28, según la evaluación mediante citometría de flujo. La unión a EpCAM en células HT29, evaluada mediante citometría de flujo, se muestra en la **figura 35B**. El anti-DP47 funcionó como control negativo para la unión inespecífica de los compuestos de anticuerpo a las células. Los puntos representan medias de duplicados técnicos. En la **figura 35C** se muestra que EpCAM-CD28 (P1AE9051) mejora las respuestas de los linfocitos T al estímulo anti-CD3 en el ensayo indicador de IL-2. Se muestra la activación de células indicadoras de IL-2 medida mediante la lectura de luminiscencia después de 6 horas de coincubación con HT-29 en presencia de concentraciones subóptimas de IgG anti-CD3 (10 nM) y concentraciones en aumento de EpCAM-CD28. Los puntos representan medias de duplicados técnicos.

Las **figuras 36A** a **36C** se refieren a la caracterización funcional de moléculas biespecíficas de unión al antígeno HER3-CD28. En la **figura 36A** se muestra que HER3-CD28 (P1AF0151) se une a CD28 humano en células CHO-k1 que expresan CD28, según la evaluación mediante citometría de flujo. La unión de HER3-CD28 a HER3 en células T-47D, evaluada mediante citometría de flujo, se muestra en la **figura 36B**. El anti-DP47 funcionó como control negativo para la unión inespecífica de los compuestos de anticuerpo a las células. Los puntos son medias de duplicados técnicos. En la **figura 36C** se muestra que HER3-CD28 (P1AF0151) mejora las respuestas de los linfocitos T al estímulo anti-CD3 en el ensayo indicador de IL-2. Se muestra la activación de células

indicadoras de IL-2 medida mediante la lectura de luminiscencia después de 6 horas de coincubación con células T-47D en presencia de concentraciones subóptimas del clon OKT3 de IgG anti-CD3 (10 nM) y concentraciones en aumento de HER3-CD28. Los puntos representan medias de duplicados técnicos.

En las **figuras 37A** a **37C** se muestran ilustraciones esquemáticas de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre un antígeno de superficie celular de un mieloma múltiple (MM) como se describe en el ejemplo 16.

La **figura 37A** muestra una molécula biespecífica de unión al antígeno GPRC5D-CD28 en formato 1+1, en donde el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab (intercambio VH/VL) y en el fragmento Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CPRC5D hay modificaciones cargadas para soportar el apareamiento correcto de las cadenas livianas. El dominio Fc tiene modificaciones de botón en ojal y las mutaciones P329G LALA para anular la unión a los receptores Fcγ.

En la **figura 37B**, el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 comprende modificaciones cargadas y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD38 se representa como crossFab (intercambio VH/VL).

La **figura 37C** ilustra una molécula biespecífica de unión al antígeno BCMA-CD28 en formato 1+1, en donde la molécula de Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD28 se representa como crossFab (intercambio VH/VL) y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno BCMA comprende modificaciones cargadas.

La **figura 37D** ilustra el anticuerpo biespecífico anti-GPRC5D/anti-CD3 (GPRC5D TCB) en formato 2+1, en donde las moléculas de Fab que tienen el dominio de unión al antígeno GPCR5D comprenden modificaciones cargadas y el Fab que tiene el dominio de unión al antígeno CD3 se representa como crossFab (intercambio VH/VL).

Las **figuras 38A a 38F** se refieren a la unión de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de un mieloma múltiple (MM) a las células (ejemplo 17.1). Se muestra la unión de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno a CD28 humano en células CHO huCD28 cl45 (**figura 38A** y **38E**), a CD38 humano en células OCI-Ly18 (**figura 38B**), BCMA humano (antígeno de maduración de linfocitos B, **figura 38C**) en células IM-9 y a GPRC5D humano en células CHO huGPRC5D L2 (**figura 38D** y **38F**) expresada en las líneas celulares indicadas. Se representan los valores de fluorescencia media relativa (MFI) a partir de

duplicados con SD. Los valores de EC_{50} de unión se calcularon mediante GraphPadPrism y se incluyen en la tabla 38.

La activación de linfocitos T de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de un mieloma múltiple (MM) según la evaluación en el ensayo indicador de IL-2 se muestra en las **figuras 39A** a **39F**. Se muestra el ensayo celular indicador de IL2 después de 5 y 22 horas de incubación, como se determina mediante la luminiscencia. Las células diana que expresan GPRC5D y efectoras indicadoras de IL2 se incubaron a una relación de efector con respecto a diana (E:T) de 5:1. GPRC5D-TCB se agregó a un concentración de ensayo final fija de 1 nM, las moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre MM indicadas se titularon como se indica. Las curvas representativas de respuesta a la dosis se representan para CD38-CD28 en la **figura 39A** (después de 5 horas de incubación) y la **figura 39B** (después de 22 horas); para BCMA-CD28, en la **figura 39C** (después de 5 horas) y la **figura 39D** (después de 22 horas); y para GPRC5D-CD28, en la **figura 39E** (después de 5 horas) y la **figura 39F** (después de 22 horas de incubación).

Las **figuras 40A** a **40C** muestran el refuerzo de la lisis mediada por linfocitos T de la línea de células de MM que expresa GPRC5D NCI-H929 en presencia de 0,2 nM de las moléculas biespecíficas CD28 indicadas CD38-CD28 (**figura 40A**), BCMA-CD28 (**figura 40B**) y GPRC5D-CD28 (**figura 40C**). La lisis se determinó después de la coincubación de linfocitos T pan humanos y células diana tumorales de MM a una relación E:T final de 1:1 durante 22 horas. Se representan duplicados técnicos con SD. Los valores de EC_{50} y los valores de área bajo la curva de la lisis de células tumorales se calcularon mediante GraphPadPrism y se representan en la tabla 39.

La **figura 41A** muestra una ilustración esquemática de una molécula biespecífica de unión al antígeno CD19-CD28 en formato 1+1 como se describe en el ejemplo 18, en donde, en el Fab que comprende el dominio de unión al antígeno CD19, los dominios de VH y VL se intercambian entre sí (crossfab de VH/VL) y en donde, en el Fab que comprende el dominio de unión al antígeno CD28, algunos aminoácidos en el dominio CH1 y CL se intercambian (variantes de carga) para permitir un mejor apareamiento con la cadena liviana. La **figura 41B** muestra una molécula correspondiente en donde el dominio de unión al antígeno CD19 se reemplazó por un dominio de unión al antígeno CD79b (crossfab anti-CD79b).

La **figura 42** se refiere a la determinación de los parámetros cinéticos y termodinámicos

de CD79b (polatuzumab) en el constructo CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (v15) 1+1. El CD79b-His recombinante soluble se capturó en el chip CM5 mediante un anticuerpo anti-penta-His, y CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (v15) 1+1 biespecífico se usó como un analito. Las líneas lisas representan un ajuste global de los datos a un modo de interacción 1:1.

En la **figura 43A** se muestran las intensidades de fluorescencia media (MFI) de la unión de la variante 15 de CD19-CD28 (P1AE9040) a cuatro líneas de linfocitos B diferentes que expresan niveles diferentes de CD19. La unión se evaluó mediante citometría de flujo. Se muestran los duplicados técnicos con SEM. En la **figura 43B** se representa la tinción de FACS para CD19 de las cuatro líneas de linfocitos B diferentes (MFI).

La unión de CD19-CD28 con distintas afinidades de CD28 a CD19 y CD28 humano en células se muestra en las **figuras 44A** y **44B**. Se muestran las intensidades de fluorescencia media (MFI) de la unión a células CHOk1-CD28 (**figura 44A**) y de la unión a CD19 en células Nalm6 (**figura 44B**). Los puntos representan los duplicados técnicos con SEM. Los valores de EC_{50} correspondientes se muestran en la tabla 42 (CHOk1-CD28) y en la tabla 43 (Nalm6) del ejemplo 20. La unión se evaluó mediante citometría de flujo.

En las **figuras 45A** a **45D** se muestra que CD19-CD28v15 mejora CD20-TCB en el ensayo indicador de IL-2 en presencia de diferentes líneas de linfocitos B. Se muestra la activación de células indicadoras de IL-2 medida mediante la lectura de luminiscencia (LUM) después de 6 horas de coincubación con diferentes líneas de linfocitos B en presencia de concentraciones subóptimas de CD20-TCB y concentraciones en aumento de CD19-CD28v15. Los puntos representan los duplicados técnicos con SEM. La concentración subóptima de CD20-TCB difiere de las líneas celulares diana: 10 nM para Nalm6, 0,05 nM para RCK8, WSU DLCL2 y Z138.

La **figura 46** ilustra que CD19-CD28 con diversas afinidades de CD28 mejora la activación de linfocitos T mediada por CD20-TCB. Se muestra la activación de células indicadoras de IL-2 medida mediante la lectura de luminiscencia (LUM) después de 6 horas de coincubación con linfocitos B Nalm6 B en presencia de concentraciones subóptimas de CD20-TCB (10 nM) y concentraciones en aumento de CD19-CD28v15. Los puntos representan los duplicados técnicos con SEM.

Se evaluó el estado de la activación de linfocitos T derivados de PBMC después del cocultivo con células diana que expresan CD20 (Nalm6) (E:T relación 5:1) y CD19-CD28 en ausencia o presencia de CD20-TCB. La actividad de CD19-CD28 en ausencia o

presencia de señales de TCR se muestra en la **figura 47**. Se muestra la expresión de CD69 de linfocitos T CD4 derivados de PBMC después de 48 h de coincubación con células Nalm6, con concentraciones en aumento de CD19-CD28v15 en presencia o ausencia de 10 nM de CD20-TCB. Los puntos representan los triplicados técnicos con SEM.

En las **figuras 48A** a **48D** se ilustra que CD19-CD28 solo no induce la secreción de citocina en las PBMC. Se muestra la liberación de citocina en PBMC enteras después de 48 horas de cocultivo con moléculas CD19-CD28 en presencia o ausencia de CD20-TCB. Las barras representan media +SEM de triplicados técnicos. Los datos representan 2 donantes. La secreción de citocina se evaluó mediante el ensayo Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex. Se muestran IFNγ (**figura 48A**), IL-2 (**figura 48B**), IL-10 (**figura 48C**) y TNF (**figura 48D**).

En las **figuras 49A** y **49B** se muestran los datos funcionales relacionados con CD79b-CD28, mejora CD20-TCB en el ensayo indicador de IL-2 en presencia de linfocitos B Z138. En la **figura 49A** se muestran las intensidades de fluorescencia media (MFI) de la unión a CD79b en linfocitos B Z138. En la **figura 49B** se muestra que CD79Bb-CD28 mejora CD20-TCB en el ensayo indicador de IL-2 en presencia de linfocitos B Z138. Se muestra la activación de células indicadoras de IL-2 medida mediante la lectura de luminiscencia (LUM) después de 6 horas de coincubación con diferentes líneas de linfocitos B en presencia de concentraciones subóptimas de CD20-TCB y concentraciones en aumento de CD79b-CD28. Los puntos representan los duplicados técnicos con SEM.

La **figura 50** muestra el diseño del estudio de un estudio de eficacia con anticuerpos biespecíficos contra CD19-CD28 (comparación de dos clones de CD28 diferentes) en xenoinjerto de NALM6 en ratones humanizados. Se muestra el diseño y los diferentes grupos de tratamiento.

Las **figuras 51A a 51D** muestran los resultados del estudio de eficacia con CD19-CD28 en xenoinjerto de NALM6 en ratones humanizados. Se muestra el volumen tumoral promedio (**figura 51A**) o el crecimiento de los tumores en ratones individuales para los tres grupos de tratamiento como se representa en el eje y (**figura 51B a 51D**). La **figura 51B** muestra el crecimiento del tumor para cada ratón individual en el grupo de vehículo; la **figura 51C**, de los ratones tratados con CD19-CD28 (variante 15); y **figura 51D**, de los ratones tratados con CD19-CD28 (variante 8). Se puede observar que CD19-CD28

(variante 8) como un agente único indujo una inhibición del crecimiento del tumor más fuerte en comparación con CD19-CD28 (variante 15).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se usa habitualmente en el estado de la técnica a la cual pertenece la presente invención. Para propósitos de interpretación de la presente memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, siempre que sea apropiado, los términos que se usan en singular también incluirán el plural, y viceversa.

Como se usa en la presente, la expresión "**molécula de unión al antígeno**" se refiere, en su sentido más amplio, a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Los ejemplos de moléculas de unión al antígeno son anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos y proteínas de armazón de unión al antígeno.

Como se usa en la presente, la expresión "**dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno asociado al tumor**" o "porción capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno es capaz de activar la señalización través de su antígeno de célula diana. En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno es capaz de dirigir la entidad a la cual está unida (por ejemplo, el anticuerpo contra CD28) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o estroma tumoral que tiene el determinante antigénico. Los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de célula diana incluyen los anticuerpos y fragmentos de estos como se define con mayor detalle en la presente. Además, los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de célula diana incluyen las proteínas de armazón de unión al antígeno como se define con mayor detalle en la presente, por ejemplo, los dominios de unión que se basan en proteínas de repetición diseñadas o dominios de repetición diseñados (ver, por ejemplo, WO 2002/020565).

En relación con una molécula de unión al antígeno, es decir, un anticuerpo o fragmento de este, la expresión "dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de célula

diana" se refiere a la parte de la molécula que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria con una parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables del anticuerpo (también denominados regiones variables del anticuerpo). En particular, un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno comprende una región variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y una región variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo. En otro aspecto, el "dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor" también puede ser un fragmento Fab o un fragmento crossFab. En otro aspecto, el "dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor" también puede ser un fragmento Fab o un fragmento crossFab. Como se usa en la presente, los términos "primero", "segundo" o "tercero" con respecto a los dominios de unión al antígeno, etc. se usan para distinguir cuando existe más de una porción de cada tipo. El uso de dichos términos no confiere un orden o una orientación específica de la porción a menos que así se exprese de manera explícita.

Como se usa en la presente, la expresión "**dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de superficie de linfocitos B**" o "porción capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico en la superficie del linfocito B. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno es capaz de activar la señalización través de su antígeno de célula diana. En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno es capaz de dirigir la entidad a la cual se une (por ejemplo, el agonista CD28) a un sitio diana, por ejemplo, en el linfocito B. Los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B incluyen los anticuerpos y fragmentos de estos como se define con mayor detalle en la presente. Además, los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B incluyen las proteínas de armazón de unión al antígeno como se define con mayor detalle en la presente, por ejemplo, los dominios de unión que se basan en proteínas de repetición diseñadas o dominios de repetición diseñados (ver, por ejemplo, WO 2002/020565).

La expresión "**dominio de unión al antígeno que se une a un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)**" o "porción capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)" se refiere a una molécula de polipéptido que se une específicamente a un determinante antigénico en la célula de

mieloma múltiple (MM). En un aspecto, el dominio de unión al antígeno es capaz de activar la señalización través de su antígeno de célula diana. En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno es capaz de dirigir la entidad a la cual se une (por ejemplo, el agonista CD28) a un sitio diana, por ejemplo, en la célula MM. Los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM) incluyen los anticuerpos y fragmentos de estos como se define con mayor detalle en la presente. Además, los dominios de unión al antígeno capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B incluyen las proteínas de armazón de unión al antígeno como se define con mayor detalle en la presente, por ejemplo, los dominios de unión que se basan en proteínas de repetición diseñadas o dominios de repetición diseñados (ver, por ejemplo, WO 2002/020565).

El término **"anticuerpo"** se usa en la presente en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad de unión al antígeno deseada.

La expresión **"anticuerpo monoclonal**", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal, en donde dichas variantes, en general, están presentes en cantidades menores. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que generalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación del anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno.

El término anticuerpo **"monoespecífico"**, como se usa en la presente, indica un anticuerpo que tiene uno o más sitios de unión, cada uno de los cuales se une al mismo epítopo del mismo antígeno. El término **"biespecífico"** significa que la molécula de unión al antígeno puede unirse específicamente al menos a dos determinantes antigénicos diferentes. Típicamente, una molécula de unión al antígeno biespecífica comprende dos sitios de unión al antígeno, cada uno de los cuales es específico para un determinante antigénico diferente. Sin embargo, una molécula biespecífica de unión al antígeno también puede comprender sitios de unión al antígeno adicionales que se unen a otros

determinantes antigénicos. En algunos aspectos, la molécula biespecífica de unión al antígeno puede unirse simultáneamente a dos determinantes antigénicos, particularmente, dos determinantes antigénicos que se expresan en dos células diferentes o en la misma célula. Por ende, el término "**biespecífico**" de acuerdo con la presente invención también puede incluir una molécula triespecífica, por ejemplo, una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo contra CD28 y dos dominios de unión al antígeno dirigidos a dos antígenos de célula diana diferentes.

El término "**valente**", como se usa en la presente solicitud, indica la presencia de una cantidad específica de sitios de unión específicos para un determinante antigénico distinto en una molécula de unión al antígeno que son específicos para un determinante antigénico distinto. Como tales, los términos "bivalente", "tetravalente" y "hexavalente" indican la presencia de dos sitios de unión, cuatro sitios de unión y seis sitios de unión específicos para un determinante antigénico determinado, respectivamente, en una molécula de unión al antígeno. En aspectos particulares de la invención, las moléculas biespecíficas de unión al antígeno de acuerdo con la invención pueden ser monovalentes para un determinante antigénico determinado, lo que significa que tienen solamente un sitio de unión para dicho determinante antigénico o pueden ser bivalentes o tetravalentes para un determinante antigénico determinado, lo que significa que tienen dos sitios de unión o cuatro sitios de unión, respectivamente, para dicho determinante antigénico.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en la presente de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo. La expresión "**anticuerpos nativos**" se refiere a moléculas de inmunoglobulina naturales con distintas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas unidas mediante un enlace disulfuro. Del extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también denominados región constante de la cadena pesada. De manera similar, del extremo N al C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también denominada dominio liviano variable o dominio variable de la cadena liviana, seguido de un dominio constante de la cadena liviana (CL), también denominado región constante de la cadena liviana. La cadena pesada de un anticuerpo se puede asignar a uno de cinco tipos, denominados α (IgA), δ (IgD), ε (IgE), γ (IgG) o μ (IgM), algunos de los cuales se pueden dividir adicionalmente

en subtipos, por ejemplo, γ1 (IgG1), γ2 (IgG2), γ3 (IgG3), γ4 (IgG4), α1 (IgA1) y α2 (IgA2). La cadena liviana de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en función de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

Un **"fragmento de anticuerpo"** se refiere a una molécula distinta a un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, fragmentos crossFab, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos de dominio único. Para obtener una reseña de determinados fragmentos de anticuerpos, ver Hudson *et al*., Nat. Med. 9, 129-134 (2003). Para obtener una reseña sobre fragmentos scFv, ver, por ejemplo, Plückthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315, (1994); ver también WO 93/16185; y las patentes estadounidenses N.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para un análisis de fragmentos Fab y F(ab')2 que comprenden residuos de epítopo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida aumentada *in vivo*, ver la patente estadounidense N.º 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos, ver, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al*., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger *et al*., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos se describen también en Hudson *et al*. Nat. Med. 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo. En algunas formas de realización, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante diversas técnicas, que incluyen, entre otras, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en la presente.

La digestión de papaína de anticuerpos intactos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", que contienen, cada uno, los dominios variables de las cadenas pesada y liviana y también el dominio constante de la cadena liviana y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Por lo tanto, como se usa en la presente, la expresión "**fragmento Fab**" se refiere a un fragmento de

anticuerpo que comprende un fragmento de la cadena liviana que comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) y un dominio constante de la cadena liviana (CL), y un dominio variable de la cadena pesada (VH) y un primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH son fragmentos Fab' en donde el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tiene(n) un grupo tiol libre. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación al antígeno (dos fragmentos Fab) y una parte de la región Fc.

La expresión **"fragmento crossFab"** o "fragmento xFab" o "fragmento Fab con entrecruzamiento" se refiere a un fragmento Fab, en donde se intercambian las regiones variables o las regiones constantes de las cadenas pesada y liviana. Dos composiciones diferentes de cadena de una molécula Fab entrecruzada son posibles y están comprendidas en los anticuerpos biespecíficos de la invención: Por un lado, se intercambian las regiones variables de la cadena pesada y liviana de Fab, es decir, la molécula Fab entrecruzada comprende una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena liviana (VL) y el dominio constante de la cadena pesada (CH1), y una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio constante de la cadena liviana (CL). Dicha molécula Fab entrecruzada también se denomina CrossFab $_{(VLVH)}$. Por otro lado, cuando se intercambian las regiones constantes de la cadena pesada y liviana de Fab, la molécula Fab entrecruzada comprende una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio constante de la cadena liviana (CH1), y una cadena de péptidos compuesta por el dominio variable de la cadena liviana (VL) y el dominio constante de la cadena pesada (CL). Dicha molécula Fab entrecruzada también se denomina CrossFab $_{(CLCH1)}$.

Un "fragmento Fab monocatenario" o "**scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena liviana (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena liviana (CL) de anticuerpo y un ligador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho ligador tienen uno de los siguientes órdenes en la dirección extremo N a extremo C: a) VH-CH1-ligador-VL-CL, b) VL-CL-ligador-VH-CH1, c) VH-CL-ligador-VL-CH1 o d) VL-CH1-ligador-VH-CL; y en donde dicho ligador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos, preferentemente, de entre 32 y 50 aminoácidos. Dichos fragmentos Fab monocatenarios se estabilizan a través del puente disulfuro natural entre

el dominio CL y el dominio CH1. Además, estas moléculas Fab monocatenarias se pueden estabilizar de manera adicional mediante la generación de puentes disulfuro intercatenarios a través de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, posición 44 en la cadena pesada variable y posición 100 en la cadena liviana variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "fragmento Fab monocatenario de entrecruzamiento" o "**x-scFab**" es un polipéptido que consiste en un dominio variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpo, un dominio constante 1 (CH1) de anticuerpo, un dominio variable de la cadena liviana (VL) de anticuerpo, un dominio constante de la cadena liviana (CL) de anticuerpo y un ligador, en donde dichos dominios de anticuerpo y dicho ligador tienen uno de los siguientes órdenes en la dirección extremo N a extremo C: a) VH-CL-ligador-VL-CH1 y b) VL-CH1-ligador-VH-CL; en donde VH y VL forman un sitio de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno y en donde dicho ligador es un polipéptido de al menos 30 aminoácidos. Además, estas moléculas x-scFab se pueden estabilizar de manera adicional mediante la generación de puentes disulfuro intercatenarios a través de la inserción de residuos de cisteína (por ejemplo, posición 44 en la cadena pesada variable y posición 100 en la cadena liviana variable de acuerdo con la numeración de Kabat).

Un "**fragmento variable monocatenario** (**scFv**)" es una proteína de fusión de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y liviana (V_L) de un anticuerpo, conectado con un péptido ligador corto de diez a alrededor de 25 aminoácidos. En general, el ligador es rico en glicina para flexibilidad, así como serina o treonina para solubilidad, y puede conectar el extremo N de la V_H con el extremo C de la V_L, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad del anticuerpo original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del ligador. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96). Además, los fragmentos de anticuerpos comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio VH, es decir, son capaces de ensamblarse con un dominio VL, o de un dominio VL, es decir, son capaces de ensamblarse con un dominio VH a un sitio de unión al antígeno funcional y, de esta manera, proporcionar la propiedad de unión al antígeno de los anticuerpos de longitud completa.

Las "**proteínas de armazón de unión al antígeno**" son conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, la fibronectina y las proteínas de repetición de anquirina diseñada (DARPins) se usaron como armazones alternativos para los dominios de unión al antígeno, ver, por ejemplo, Gebauer y Skerra, Engineered protein scaffolds as next-

generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009) y Stumpp *et al.*, Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008). En un aspecto de la invención, una proteína de armazón de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en CTLA-4 (Evibody), lipocalinas (anticalina), una molécula derivada de la proteína A, tal como el dominio Z de la proteína A (aficuerpo), un dominio A (avímero/maxicuerpo), una transferrina sérica (transcuerpo); una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin), un dominio variable de la cadena liviana o cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de dominio único, sdAb), un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo (nanocuerpo, aVH), fragmentos V_{NAR}, una fibronectina (adnectina), un dominio de lectina de tipo C (tetranectina); un dominio variable de betalactamasa de receptor de antígeno nuevo (fragmentos V_{NAR}), un gamma cristalino o ubiquitina humana (moléculas Affilin); un dominio tipo Kunitz de inhibidores de proteasa humana, microcuerpos, tales como las proteínas de la familia Knottin, aptámeros de péptidos y fibronectina (adnectina). El CTLA-4 (antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico) es un receptor de la familia CD28 expresado principalmente en linfocitos T $CD4^+$. Su dominio extracelular tiene un dominio Ig de tipo dominio variable. Los bucles que corresponden a las CDR de anticuerpos se pueden sustituir con secuencias heterólogas para conferir diferentes propiedades de unión. Las moléculas de CTLA-4 modificadas por ingeniería genética para tener diferentes especificidades de unión también se conocen como Evibodies (por ejemplo, US7166697B1). Las Evibodies tienen aproximadamente el mismo tamaño que la región variable aislada de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio). Para obtener más información, ver Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001). Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas, tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Tienen una estructura secundaria de lámina beta rígida con diversos bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que se puede modificar por ingeniería genética para unirse a diferentes antígenos diana. Las anticalinas tienen entre 160-180 aminoácidos de tamaño y derivan de lipocalinas. Para obtener más información, ver Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 y US20070224633. Un aficuerpo es un armazón derivado de la proteína A de *Staphylococcus aureus* que se puede modificar por ingeniería genética para unirse al antígeno. El dominio consiste en un haz de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se generaron colecciones mediante la aleatorización de residuos de superficie. Para obtener más información, ver Protein Eng. Des. Sel. 2004, 17, 455-462 y EP 1641818A1. Los avímeros son proteínas de dominios múltiples derivadas de la familia de armazón de dominio A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos

adoptan una estructura definida unida mediante un puente disulfuro. La diversidad se genera mediante la transposición de la variación natural exhibida por la familia de los dominios A. Para obtener más información, ver Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (junio de 2007). Una transferrina es una glucoproteína monomérica de transporte sérico. Las transferrinas se pueden modificar por ingeniería genética para unirse a diferentes antígenos diana mediante la inserción de secuencias de péptidos en un bucle de superficie permisivo. Los ejemplos de armazones de transferrina modificados por ingeniería genética incluyen el transcuerpo. Para obtener más información, ver J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999). Las proteínas de repetición de anquirina diseñada (DARPins) derivan de anquirina, que es una familia de proteínas que media la unión de las proteínas integrales de membrana al citoesqueleto. Una repetición de anquirina única es un motivo de 33 residuos que consiste en dos hélices alfa y una vuelta beta. Se pueden modificar por ingeniería genética para unirse a diferentes antígenos diana mediante la aleatorización de los residuos en la primera hélice alfa y una vuelta beta de cada repetición. Su interfase de unión se puede aumentar mediante el aumento de la cantidad de módulos (un método de maduración por afinidad). Para obtener más información, ver J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y US20040132028A1. Un anticuerpo de dominio único es un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único. Los primeros dominios únicos derivaron del dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo de camélidos (nanocuerpos o fragmentos V_HH). Además, la expresión “anticuerpo de dominio único” incluye un dominio variable de la cadena pesada humano autónomo (aVH) o fragmentos V_{NAR} derivados de tiburones. La fibronectina es un armazón que se puede modificar por ingeniería genética para unirse al antígeno. Las adnectinas consisten en una estructura principal de la secuencia de aminoácidos natural del 10.º dominio de las 15 unidades de repetición de fibronectina humana de tipo III (FN3). Se pueden modificar por ingeniería genética tres bucles en un extremo del sándwich beta para permitir que una adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para obtener más información, ver Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005), US20080139791, WO2005056764 y US6818418B1. Los aptámeros de péptidos son moléculas de reconocimiento de combinaciones que consisten en una proteína de armazón constante, típicamente tioredoxina (TrxA), que contiene un bucle de péptidos variable restringido insertado en el sitio activo. Para obtener más información, ver Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005). Los microcuerpos derivan de microproteínas naturales de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína, los ejemplos de

microproteínas incluyen KalataBI, conotoxina y knottins. Las microproteínas tienen un bucle que se puede modificar por ingeniería genética para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar el pliegue general de la microproteína. Para obtener más información sobre los dominios knottin modificados por ingeniería genética, ver WO2008098796.

Una "**molécula de unión al antígeno que se une al mismo epítopo**" que una molécula de referencia se refiere a una molécula de unión al antígeno que bloquea la unión de la molécula de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en 50 % o más y, por el contrario, la molécula de referencia bloquea la unión de la molécula de unión al antígeno a su antígeno en un ensayo de competencia en 50 % o más.

La expresión "**dominio de unión al antígeno**" se refiere a la parte de una molécula de unión al antígeno que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria con una parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, una molécula de unión al antígeno solamente se puede unir a una parte particular del antígeno, en donde dicha parte se denomina epítopo. Un dominio de unión al antígeno se puede proporcionar, por ejemplo, mediante uno o más dominios variables (también denominados regiones variables). Preferentemente, un dominio de unión al antígeno comprende un dominio variable de la cadena liviana (VL) del anticuerpo y un dominio variable de la cadena pesada (VH) del anticuerpo.

Como se usa en la presente, la expresión "**determinante antigénico**" es sinónimo de "antígeno" y "epítopo", y se refiere a un sitio (por ejemplo, un tramo contiguo de aminoácidos o una configuración conformacional formada por diferentes regiones de aminoácidos no contiguos) en una macromolécula polipeptídica a la que se une una porción de unión al antígeno, y forman un complejo porción de unión al antígeno-antígeno. Se pueden encontrar determinantes antigénicos útiles, por ejemplo, en las superficies de tumores celulares, en las superficies de células infectadas con virus, en las superficies de otras células enfermas, en la superficie de células inmunitarias, libres en suero sanguíneo y/o en la matriz extracelular (ECM). Las proteínas útiles como antígenos en la presente pueden ser cualquier forma nativa de las proteínas de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. En una forma de realización particular, el antígeno es una proteína humana. Cuando se hace referencia a una proteína específica en la presente, el término abarca la proteína "de longitud completa" sin procesar, así como también cualquier forma de la proteína que resulte del procesamiento en la célula. El término abarca, además, las variantes naturales de la

proteína, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

La expresión "**unión específica**" se refiere a que la unión es selectiva para el antígeno y puede distinguirse de interacciones no deseadas o no específicas. La capacidad de una molécula de unión al antígeno para unirse a un antígeno específico puede medirse mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas habituales para la persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (que se analiza en un instrumento BIAcore) (Liljeblad *et al.*, Glyco J 17, 323-329 (2000)), y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). En una forma de realización, el grado de unión de una molécula de unión al antígeno a una proteína no relacionada es menor de alrededor de 10 % de la unión de la molécula de unión al antígeno al antígeno según la medición, por ejemplo, mediante SPR. En algunas formas de realización, una molécula que se une al antígeno tiene una constante de disociación (Kd) de ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM o ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

"**Afinidad**" o "**afinidad de unión**" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con respecto a su componente Y puede estar representada de manera general por la constante de disociación (Kd), que es la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación (koff y kon, respectivamente). Por lo tanto, las afinidades equivalentes pueden comprender diferentes constantes de velocidad, siempre y cuando la relación de las constantes de velocidad permanezca igual. La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en el estado de la técnica, que incluye aquellos descritos en la presente. Un método particular para medir la afinidad es la resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Un "**antígeno asociado al tumor**" o TAA, como se usa en la presente, se refiere a un determinante antigénico presentado en la superficie de una célula diana, por ejemplo, una célula en un tumor, tal como una célula cancerosa, una célula del estroma tumoral, un linfocito B maligno o una célula de melanoma. En algunos aspectos, el antígeno de células diana es un antígeno en la superficie de una célula tumoral. En un aspecto, el

TAA se selecciona del grupo que consiste en la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), el receptor alfa de folato (FolR1), el proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), p95HER2, EpCAM, HER3, CD30 o TPBG (5T4), CD19, CD79b, CD20, CD22, CD37, CD38, BCMA y GPRC5D. En un aspecto particular, el TAA se selecciona del grupo que consiste en la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), el receptor alfa de folato (FolR1), el proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y p95HER2. En otro aspecto particular, el TAA se selecciona del grupo que consiste en la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), EpCAM, HER3, CD30 o TPBG (5T4). En un aspecto particular, el antígeno asociado al tumor es la proteína de activación de fibroblastos (FAP) o el antígeno carcinoembrionario (CEA). En un aspecto, el TAA es un antígeno de una superficie de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD79b, CD20, CD22 y CD37, en particular, CD19 y CD79b. En un aspecto, el TAA es un antígeno de superficie celular del mieloma múltiple (MM) seleccionado del grupo que consiste en CD38, BCMA y GPRC5D.

La expresión “**proteína de activación de fibroblastos (FAP)**”, también conocida como prolil endopeptidasa FAP o seprasa (EC 3.4.21), hace referencia a cualquier FAP nativa de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. El término engloba FAP “de longitud completa” sin procesar, así como cualquier forma de FAP como resultado del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de FAP naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En una forma de realización, la molécula de unión al antígeno de la invención se puede unir específicamente a FAP humana, de ratón y/o de *Macaca fascicularis*. La secuencia de aminoácidos de FAP humana se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso Q12884 (versión 149, SEQ ID NO:2), o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2. El dominio extracelular (ECD) de FAP humana se extiende de la posición de aminoácido 26 a 760. La secuencia de aminoácidos de FAP ECD humano etiquetado con His se muestra en SEQ ID NO:135. La secuencia de aminoácidos de FAP de ratón se muestra en UniProt con el número de acceso P97321 (versión 126, SEQ ID NO:136), o NCBI RefSeq NP_032012.1. El dominio extracelular (ECD) de FAP de ratón se extiende de la posición

de aminoácido 26 a 761. La SEQ ID NO:137 muestra la secuencia de aminoácidos de FAP ECD de ratón etiquetado con His. La SEQ ID NO 138 muestra la secuencia de aminoácidos de FAP ECD de *Macaca fascicularis* etiquetado con His. Preferentemente, una molécula de unión anti-FAP de la invención se une al dominio extracelular de FAP.

La expresión "**antígeno carcinoembrionario (CEA)**", también conocido como molécula 5 de adhesión a la célula relacionada con antígeno carcinoembrionario (CEACAM5), hace referencia a cualquier CEA nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CEA humano se muestra en UniProt con el número de acceso P06731 (versión 151, SEQ ID NO:3). CEA se identificó durante mucho tiempo como un antígeno asociado al tumor (Gold y Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002). CEA se clasificó originalmente como una proteína expresada solamente en el tejido fetal, pero luego se identificó en diversos tejidos adultos normales. Estos tejidos tienen principalmente origen epitelial, que incluye células del tubo gastrointestinal, las vías respiratorias y el aparato genitourinario, y células de colon, cuello uterino, glándulas sudoríparas y próstata (Nap *et al*., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988; Nap *et al*., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992). Los tumores de origen epitelial, así como sus metástasis, contienen CEA como un antígeno asociado al tumor. Mientras la presencia de CEA en sí misma no indica la transformación a una célula cancerosa, sí lo indica la distribución de CEA. En el tejido normal, CEA se expresa generalmente en la superficie apical de la célula (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)), lo cual lo hace inaccesible para el anticuerpo en el torrente sanguíneo. A diferencia del tejido normal, CEA tiende a expresarse en la superficie completa de las células cancerosas (Hammarström S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)). Este cambio en los patrones de expresión hace que CEA sea accesible para el anticuerpo que se une en las células cancerosas. Además, la expresión de CEA aumenta en las células cancerosas. Además, la mayor expresión de CEA promueve mayores adhesiones intercelulares, lo cual puede provocar metástasis (Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003). La prevalencia de la expresión de CEA en diversas entidades tumorales es generalmente muy alta. De acuerdo con los datos publicados, los análisis conocidos llevados a cabo en muestras de tejido confirmaron su alta prevalencia, con aproximadamente 95 % en carcinoma colorrectal (CRC), 90 % en cáncer de páncreas, 80 % en cáncer gástrico, 60 % en cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, en donde se coexpresa con HER3), y 40 % en cáncer

de mama; se encontró una baja expresión en el cáncer pulmonar de células pequeñas y glioblastoma.

CEA se escinde fácilmente de la superficie celular y se dispersa en el torrente sanguíneo de los tumores, directamente o mediante el sistema linfático. Debido a esta propiedad, el nivel de CEA sérico se usó como un marcador clínico para el diagnóstico de cáncer y cribado de recidiva de cáncer, particularmente, cáncer colorrectal (Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., *et al*., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini *et al*., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006).

La expresión "**molécula de adhesión a la célula epitelial (EpCAM)**" se refiere a cualquier EpCAM nativa de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La expresión abarca EpCAM "de longitud completa" sin procesar, así como cualquier forma de EpCAM como resultado del procesamiento en la célula. La expresión también abarca las variantes de EpCAM naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. En una forma de realización, la molécula de unión al antígeno de la invención se puede unir específicamente a EpCAM humana, de ratón y/o de *Macaca fascicularis*. La secuencia de aminoácidos de EpCAM humana se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso P16422 (versión 167, SEQ ID NO:68), o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_002345.2. La secuencia de aminoácidos de EpCAM de ratón se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso Q99JW5 (versión 111, SEQ ID NO:75), o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_032558.2. La molécula de adhesión a la célula epitelial (EpCAM), también conocida como transductor de señal de calcio asociado al tumor 1 (TACSTD1), 17-1A y CD326, es una glucoproteína transmembrana tipo I ~ 40 kDa que se sobreexpresa frecuentemente en cáncer de origen epitelial y mediante células madre cancerosas y, por lo tanto, es una molécula de interés significativo para el tratamiento y el diagnóstico. El dominio extracelular EpCAM se puede escindir para producir la molécula de dominio extracelular soluble EpEX, y la molécula intracelular EpICD. Se ha demostrado que EpICD se asocia con otras proteínas para formar un complejo nuclear que regula de manera ascendente la expresión de genes que promueven la proliferación celular. EpCAM también puede participar en la transición celular epitelial a mesenquimal (EMT), y puede contribuir a la formación de grandes metástasis.

"**CD30**" o "TNFRSF8" es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis

tumoral. Se expresa de manera característica en algunas neoplasias hematopoyéticas, que incluyen el linfoma anaplásico de células grandes y el linfoma de Hodgkin, entre otros. La expresión variable de CD30 tanto en células linfoides normales como malignas centró la investigación en el entendimiento de la patogénesis de la regulación ascendente de CD30, su contribución a la linfomagénesis a través de mecanismos antiapoptósicos, y su efecto en la supervivencia celular. Dada la restricción de CD30 a algunos tipos de tumor, la extensión lógica de esto fue intentar explotarlo como una diana terapéutica. CD30 es un receptor de la glucoproteína transmembrana de 120 kD que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), con dominios intracelulares, transmembranales y extracelulares, y la secuencia de aminoácidos de CD30 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P28908 (SEQ ID NO:472).

El término "**TPBG**" se refiere a la glucoproteína trofoblasto, también denominada "5T4". TBPG es una glucoproteína transmembrana rica en leucina que participa en la adhesión celular. En adultos, esta proteína es altamente expresada en muchas células tumorales y se asocia con resultados clínicos desfavorables en numerosos tipos de cáncer. Se refiere a cualquier TPBG nativa de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de TPBG humana se muestra en UniProt con el número de acceso Q13641 (SEQ ID NO: 473).

El término "**FolR1**" se refiere al receptor alfa de folato y se identificó como una diana terapéutica y de pronóstico potencial en diversos tipos de cáncer. Se refiere a cualquier FolR1 nativa de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de FolR1 humana se muestra en UniProt con el número de acceso P15328 (SEQ ID NO:139), FolR1 murina tiene la secuencia de aminoácidos de UniProt con el número de acceso P35846 (SEQ ID NO:140) y FolR1 de *Macaca fascicularis* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en UniProt con el número de acceso G7PR14 (SEQ ID NO:141). FolR1 es una proteína N-glucosilada expresada en la membrana plasmática de las células. FolR1 tiene una alta afinidad para el ácido fólico y para diversos derivados reducidos del ácido fólico y media en la administración del folato fisiológico, 5-metiltetrahidrofolato, al interior de las células. FOLR1 es una diana deseable para el tratamiento contra el cáncer dirigido a FOLR1, dado que se sobreexpresa en la gran mayoría de los tipos de cáncer de ovario, así como en muchos tipos de cáncer

uterino, de endometrio, pancreático, renal, pulmonar y de mama, mientras que la expresión de FOLR1 en tejidos normales se restringe a la membrana apical de las células epiteliales en los túbulos proximales del riñón, neumocitos alveolares del pulmón, vejiga, testículos, plexo coroideo y tiroides. Los estudios recientes identificaron que la expresión de FolR1 es particularmente alta en tipos de cáncer de mama triple negativo (Necela *et al*. PloS One 2015, 10(3), e0127133).

La expresión "**proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP)**", también conocido como proteoglucano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), hace referencia a cualquier MCSP nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de MCSP humano se muestra en UniProt con el número de acceso Q6UVK1 (versión 103, SEQ ID NO:142). MCSP es un proteoglucano de sulfato de condroitina de membrana integral altamente glucosilado que consiste en un componente de glucoproteína de 280 kDa ligado a N y un componente de proteoglucano de sulfato de condroitina de 450 kDa expresado en la membrana celular (Ross *et al*., *Arch. Biochem. Biophys. 1983,* 225:370-38). MCSP se distribuye más ampliamente en diversas células normales y transformadas. En particular, MCSP se encuentra en casi todas las células basales de la epidermis. MCSP se expresa de manera diferenciada en células de melanoma, y se observó que se expresa en más de 90 % de los nevos benignos y lesiones de melanoma analizados. También se observó que MCSP se expresa en tumores de origen no melanocítico, que incluyen carcinoma de células basales, diversos tumores de origen de cresta neural, y en carcinomas de mama.

La expresión "**receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**", también denominado protooncogén c-ErbB-1 o receptor tirosina-proteína quinasa erbB-1, hace referencia a cualquier EGFR nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de EGFR humano se muestra en UniProt con el número de acceso P00533 (versión 211, SEQ ID NO:143). El protooncogén "**HER2**", (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) codifica una proteína tirosina quinasa (p185HER2) que se relaciona con y es de alguna manera homóloga al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. HER2 también es conocido en el estado de la técnica como c-erbB-2, y algunas veces por el nombre del homólogo de rata, neu. La amplificación y/o sobreexpresión de HER2 se asocia con

múltiples neoplasias humanas y parece estar involucrada íntegramente en la progresión de 25-30 % del cáncer de mama y de ovario en seres humanos. Además, el alcance de la amplificación se correlaciona inversamente con la mediana del tiempo de supervivencia del paciente observada (Slamon, D. J. *et al*., Science 244:707-712 (1989)). La secuencia de aminoácidos de HER2 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P04626 (versión 230, SEQ ID NO:144). El término "**p95HER2**", como se usa en la presente, se refiere a un fragmento del extremo carboxi (CTF) de la proteína del receptor HER2, que también se conoce como "611-CTF" o "100-115 kDa p95HER2". El fragmento p95HER2 se genera en la célula a través del inicio de la traducción de mARN de HER2 en la posición del codón 611 de la molécula HER2 de longitud completa (Anido *et al*, EMBO J 25; 3234-44 (2006)). Tiene un peso molecular de 100 a 115 kDa y se expresa en la membrana celular, en donde puede formar homodímeros mantenidos por puentes disulfuro intermoleculares (Pedersen *et al*., Mol Cell Biol 29, 3319-31 (2009)). Una secuencia de ejemplo de p95HER2 humano se proporciona en SEQ ID NO: 145.

"**HER3**" o "**ErbB3**" (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3), al igual que los otros miembros de la familia del receptor tirosina quinasa ErbB, consiste en un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular contiene cuatro subdominios (I-IV). Los subdominios I y III son ricos en leucina y están principalmente involucrados en la unión al ligando. Los subdominios II y IV son ricos en cisteína y contribuyen más probablemente en la conformación y estabilidad de la proteína a través de la formación de puentes disulfuro. El subdominio II también contiene el bucle de dimerización requerido para la formación de dímero. El dominio citoplásmico contiene un segmento yuxtamembrana, un dominio quinasa, y un dominio de extremo C. Aunque no se encontraron pruebas de que la sobreexpresión, activación constitutiva o mutación sola de ErbB3 sea oncogénica, https://en.wikipedia.org/wiki/ERBB3_-_cite_note-pmid8632008-18 la proteína como un componente de heterodimerización, más significativamente con ErbB2, participa en el crecimiento, la proliferación, la resistencia quimioterapéutica y la promoción de invasión y metástasis. ErbB3 se asocia con la resistencia terapéutica diana en numerosos tipos de cáncer. La secuencia de aminoácidos de HER3 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P21860 (versión 224, SEQ ID NO:471)

Como se usa en la presente, un "**antígeno de superficie de linfocitos B**" se refiere a un determinante antigénico que se presenta en la superficie de un linfocito B, en particular, un linfocito B maligno (en ese caso, el antígeno también se denomina "antígeno de superficie de linfocitos B malignos"). Diversos antígenos de superficie de linfocitos B

resultan interesantes en términos del inmunotratamiento de neoplasias malignas hematológicas. En un aspecto, el antígeno de superficie de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD79b, CD20, CD22 y CD37.

El término "**CD19**" se refiere al antígeno de linfocitos B CD19, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B4 o antígeno de superficie de linfocitos T Leu-12 e incluye cualquier CD19 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD19 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P15391 (versión 160, SEQ ID NO:434). El término abarca CD19 humano sin procesar de longitud completa así como cualquier forma de CD19 humano que resulte del procesamiento en la célula, siempre y cuando el anticuerpo informado en la presente se una allí. CD19 es un receptor de superficie celular con una estructura distinta que se expresa en la superficie de linfocitos B humanos, que incluyen, entre otros, linfocitos pre-B, linfocitos B en desarrollo temprano (es decir, linfocitos B inmaduros), linfocitos B maduros a través de la diferenciación terminal en células plasmáticas, y linfocitos B malignos. CD19 se expresa por la mayoría de las leucemias linfoblásticas agudas pre-B (ALL), linfomas no hodgkiniano, leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B (CLL), leucemias prolinfocíticas, leucemias de tricoleucocitos, leucemias linfocíticas agudas comunes y algunas leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos nulos. La expresión de CD19 en células plasmáticas sugiere adicionalmente que se puede expresar en tumores de linfocitos B diferenciados, tales como mieloma múltiple. Por lo tanto, el antígeno de CD19 es una diana para el inmunotratamiento en el tratamiento de linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica y/o leucemia linfoblástica aguda.

"**CD79b**" se refiere a la cadena beta de proteína asociada al complejo de receptor del antígeno de linfocitos B, también denominada Ig-beta o glucoproteína específica de linfocitos B B29, e incluye cualquier CD79b nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD79b humano se muestra en UniProt con el número de acceso P40259 (versión 180, SEQ ID NO:435). CD79b es una proteína de 39 KDa que se expresa exclusivamente en linfocitos B y, junto con CD79a, inicia la cascada de transducción de señal corriente abajo del BCR, lo que conduce a la internalización del complejo BCR, su translocación a los endosomas y la presentación de antígenos. CD79 (compuesto por las subunidades CD79a y CD79b) es

un componente heterodimérico de la transducción de señal del receptor de linfocitos B, que se expresa de manera ubicua en linfomas de linfocitos B maduros y se coloca en la superficie celular mediante los progenitores más tempranos de linfocitos B comprometidos antes de la expresión de inmunoglobulina μ. El término “CD79b” abarca CD79b sin procesar “de longitud completa”, así como cualquier forma de CD79b que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD79b naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

El término “**CD20**” se refiere al antígeno de linfocitos B CD20, también conocido como antígeno de superficie de linfocitos B B1 o antígeno de superficie de leucocitos Leu-16 e incluye cualquier CD20 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD20 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P11836 (versión 149, SEQ ID NO:436). CD20 es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD que se expresa en linfocitos pre-B y linfocitos B maduros. El gen humano correspondiente es el miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarcan la membrana, también denominado MS4A1. Este gen codifica un miembro de la familia de genes 4A que abarcan la membrana. Los miembros de esta familia de proteínas nacientes se caracterizan por rasgos estructurales comunes y límites de empalme de intrón/exón similares, y presentan patrones de expresión únicos entre las células hematopoyéticas y los tejidos no linfoides. Este gen codifica la molécula de superficie de linfocito B que participa en el desarrollo y la diferenciación de los linfocitos B en las células plasmáticas. Este miembro de la familia se ubica en 11q12, entre un grupo de miembros de la familia. El empalme alternativo de este gen produce dos variantes de transcripto que codifican la misma proteína. El término “CD20” abarca CD20 sin procesar “de longitud completa”, así como cualquier forma de CD20 que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD20 naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

El término “**CD22**” se refiere al receptor de linfocitos B CD22, también conocido como molécula de adhesión celular de linfocitos B o SIGLEC2, e incluye cualquier CD22 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD22 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P20273

(versión 209, SEQ ID NO:437). CD22 es una molécula que pertenece a la familia de SIGLEC de lectinas y se encuentra en la superficie de linfocitos B maduros y en menor medida en algunos linfocitos B inmaduros. CD22 es, por lo tanto, una fosfoglucoproteína de superficie celular restringida de linfocitos B de 130-150 kDa y puede modular las señales mediadas por el receptor del antígeno de linfocitos B (BCR), así como la generación de señales independientes de BCR. El término "CD22" abarca CD22 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CD22 que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD22 naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

El término "**CD37**" se refiere al antígeno de leucocitos CD37, también conocido como tetraspanina-26 (Tspan-26), e incluye cualquier CD37 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD37 humano se muestra en UniProt con el número de acceso P11049 (versión 162, SEQ ID NO:438). La expresión de CD37 se restringe a las células del sistema inmunitario, en donde la mayor abundancia se encuentra en los linfocitos B maduros, y la menor expresión en los linfocitos T y las células mieloides. La glucoproteína CD37 es un miembro de la superfamilia de la transmembrana 4 y controla tanto las respuestas inmunitarias humorales como celulares. El término "CD37" abarca CD37 sin procesar "de longitud completa", así como cualquier forma de CD37 que resulta del procesamiento en la célula. El término también abarca las variantes de CD37 naturales, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas.

Un "**antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)**", como se usa en la presente, se refiere a un determinante antigénico que se presenta en la superficie de una célula de mieloma múltiple (MM). Diversos antígenos de superficie celular de MM resultan interesantes en términos del inmunotratamiento de mieloma múltiple. En un aspecto, el antígeno de superficie celular de MM se selecciona del grupo que consiste en CD38, BCMA y GPRC5D.

El término "**CD38**", también conocido como cúmulo de diferenciación 38 o hidrolasa de ADP ribosa cíclica, es una glucoproteína que se encuentra en la superficie de muchas células inmunitarias (glóbulos blancos), que incluyen linfocitos B, CD4+, CD8+ y células *natural killer*. CD38 también funciona en la adhesión celular, la transducción de señal y la señalización de calcio. En condiciones normales, CD38 se expresa en niveles

relativamente bajos en células mieloides y linfoides y en algunos tejidos no hematopoyéticos. En cambio, las células plasmáticas normales y células de mieloma múltiple (MM) tienen altos niveles de expresión de CD38, lo que vuelve a CD38 una diana interesante para el direccionamiento de moléculas superficie celular en MM. CD38, como se usa en la presente, se refiere a cualquier proteína CD38 de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de CD38 humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso P28907 (SEQ ID NO:474).

El término "**BCMA**" se refiere al antígeno de maduración de linfocitos B, también denominado miembro 17 de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFRS17), y es una proteína transmembrana tipo III sin un péptido de señal y que contiene dominios extracelulares ricos en cisteína. BCMA se expresa en niveles significativamente más altos en todas las células de MM del paciente pero no en otros tejidos normales salvo las células plasmáticas normales. BCMA, junto con dos receptores relacionados del factor de activación de linfocitos B de la superfamilia TNFR (BAFF-R) y el activador transmembrana y modulador de calcio e interactor del ligando de ciclofilina (TACI), regulan de manera significativa la supervivencia y proliferación de linfocitos B, así como la maduración y diferenciación en células plasmáticas. Estos tres receptores relacionados funcionalmente soportan la supervivencia a largo plazo de los linfocitos B en diferentes etapas del desarrollo mediante la unión a BAFF y/o APRIL, sus ligandos análogos. BCMA, como se usa en la presente, se refiere a cualquier proteína BCMA de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La secuencia de aminoácidos de BCMA humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso Q02223 (SEQ ID NO:475).

El término "**GPRC5D**" se refiere al receptor acoplado a la proteína G de clase C, grupo 5, miembro D, una diana identificada de las células plasmáticas en mieloma múltiple usando secuenciación de ARN. Se informó que GPRC5D se asocia con mal pronóstico y carga tumoral en pacientes con mieloma múltiple. GPRC5D se refiere a cualquier proteína GPRC5D de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. La

secuencia de aminoácidos de GPRC5D humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso Q9NZD1 (SEQ ID NO:476).

El término "**CD28**" (cúmulo de diferenciación 28, Tp44) se refiere a cualquier proteína CD28 de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. CD28 se expresa en los linfocitos T y proporciona señales coestimuladoras que se requieren para la activación y supervivencia de los linfocitos T. La estimulación de los linfocitos T a través de CD28 además del receptor de linfocitos T (TCR) puede proporcionar una señal potente para la producción de diversas interleucinas. CD28 es el receptor para las proteínas CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) y es el único receptor B7 que se expresa constitutivamente en linfocitos T indiferenciados. La secuencia de aminoácidos de CD28 humano se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso P10747 (SEQ ID NO:1).

Un "**anticuerpo agonista**" se refiere a un anticuerpo que comprende una función agonista contra un receptor determinado. En general, cuando un ligando agonista (factor) se une a un receptor, la estructura terciaria de la proteína del receptor cambia, y el receptor se activa (cuando el receptor es una proteína de membrana, una señal de crecimiento celular o similar es normalmente transducida). Si el receptor es un tipo formador de dímero, un anticuerpo agonista puede dimerizar el receptor a una distancia y un ángulo adecuados, y actúa, de esta manera, de manera similar a un ligando. Un anticuerpo anti receptor apropiado puede imitar la dimerización de receptores llevada a cabo por ligandos y, de esta manera, puede convertirse en un anticuerpo agonista.

Una "**molécula agonista de unión al antígeno CD28**" o "molécula agonista convencional de unión al antígeno CD28" es una molécula de unión al antígeno que imita la función de los ligandos naturales CD28 (CD80 o CD86) para mejorar la activación de linfocitos T en presencia de una señal del receptor de linfocitos T ("señal 2"). Un linfocito T necesita dos señales para activarse completamente. En condiciones fisiológicas, la "señal 1" surge de la interacción de las moléculas del receptor de linfocitos T (TCR) con los complejos entre un péptido y el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígenos (APC) y la "señal 2" se proporciona mediante el acoplamiento de un receptor coestimulador, por ejemplo, CD28. Una molécula agonista de unión al antígeno CD28 puede coestimular a los linfocitos T (señal 2). También puede inducir la proliferación de linfocitos T y secreción de citocina en combinación con una

molécula con especificidad para el complejo TCR; sin embargo, la molécula agonista de unión al antígeno CD28 no puede activar por completo los linfocitos T sin estimulación adicional del TCR. Existe, sin embargo, una subclase de moléculas de unión al antígeno específico CD28, las denominadas moléculas superagonistas de unión al antígeno CD28. Una "**molécula superagonista de unión al antígeno CD28**" es una molécula de unión al antígeno CD28 que puede activar por completo los linfocitos T sin estimulación adicional del TCR. Una molécula superagonista de unión al antígeno CD28 puede inducir la proliferación de linfocitos T y secreción de citocina sin activación previa de linfocitos T (señal 1).

La expresión "**dominio variable**" o "región variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana del anticuerpo que participa en la unión de la molécula de unión al antígeno al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo tienen generalmente estructuras similares, en donde cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Ver, por ejemplo, Kindt *et al*., Kuby Immunology, 6.ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno.

Como se usa en la presente, la expresión "región hipervariable" o "HVR" se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de unión al antígeno que son hipervariables en la secuencia y que determinan la especificidad de unión al antígeno, por ejemplo, "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"). En general, los dominios de unión al antígeno comprenden seis CDR: tres en la VH (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) y tres en la VL (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Los ejemplos de CDR de la presente incluyen:

(a) bucles hipervariables en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987));

(b) CDR en los residuos de aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), y 95-102 (H3) (Kabat *et al*., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); y

(c) contactos con el antígeno en residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum *et al., J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)).

A menos que se indique lo contrario, las CDR se determinan de acuerdo con Kabat *et al*., más arriba. Una persona del oficio de nivel medio entenderá que las designaciones de CDR también se pueden determinar de acuerdo con Chothia, más arriba, McCallum, más arriba, o cualquier otra nomenclatura aceptada científicamente. Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para las secuencias de regiones variables que es aplicable a cualquier anticuerpo. Una persona del oficio de nivel medio puede asignar de manera no ambigua este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de región variable, sin dependencia de ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Como se usa en la presente, “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración establecido en Kabat *et al*., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos de América, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en una región variable de anticuerpo están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Como se usa en la presente, la expresión “**madurado por afinidad**” en el contexto de moléculas de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos) se refiere a una molécula de unión al antígeno que deriva de una molécula de unión al antígeno de referencia. Por ejemplo, mediante mutación, se une al mismo antígeno, preferentemente, se une al mismo epítopo, que el anticuerpo de referencia; y tiene una mayor afinidad por el antígeno que la de la molécula de unión al antígeno de referencia. La maduración por afinidad generalmente implica la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en una o más CDR de la molécula de unión al antígeno. En general, la molécula de unión al antígeno madurada por afinidad se une al mismo epítopo que la molécula de unión al antígeno de referencia inicial.

“**Región estructural**” o “FR” se refiere a los residuos del dominio variable que no sean residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Una “**estructura aceptora humana**”, a los fines de la presente, es un estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura de dominio variable de la cadena liviana (VL) o una estructura de dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura de consenso humano, como se define más adelante. Una estructura aceptora humana “derivada de”

una estructura de inmunoglobulina humana o estructura de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de estas o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, la cantidad de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas formas de realización, la estructura aceptora humana de VL es idéntica en secuencia a la secuencia de estructura de inmunoglobulina humana de VL o la secuencia de estructura de consenso humana.

El término anticuerpo "**quimérico**" se refiere a un anticuerpo en donde una porción de la cadena pesada y/o liviana deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana deriva de fuentes o especies diferentes.

La "**clase**" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden también dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Un anticuerpo "**humanizado**" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un, y generalmente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, las CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una porción de una región constante del anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "**forma humanizada**" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se sometió a humanización. Otras formas de "anticuerpos humanizados" comprendidas en la presente invención son aquellas en las que la región constante se modificó o cambió adicionalmente a partir de la del anticuerpo original para obtener las propiedades de acuerdo con la invención, en especial, con respecto a la unión a C1q y/o unión al receptor Fc (FcR).

Un anticuerpo "**humano**" es uno que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras

secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

La expresión "**dominio CH1**" indica la parte de un polipéptido de la cadena pesada de anticuerpo que se extiende aproximadamente de la posición 118 de EU a la posición 215 de EU (sistema de numeración de EU de acuerdo con Kabat). En un aspecto, un dominio CH1 tiene la secuencia de aminoácidos de ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (SEQ ID NO: 477). En general, un segmento que tiene la secuencia de aminoácidos de EPKSC (SEQ ID NO:480) sigue para unir el dominio CH1 a la región bisagra.

El término "**región bisagra**" indica la parte de un polipéptido de la cadena pesada de anticuerpo que se une en una cadena pesada de anticuerpo de tipo silvestre al dominio CH1 y dominio CH2, por ejemplo, de alrededor de la posición 216 a alrededor de la posición 230 de acuerdo con el sistema de numeración de EU de Kabat, o de alrededor de la posición 226 a alrededor de la posición 230 de acuerdo con el sistema de numeración de EU de Kabat. Las regiones bisagra de otras subclases de IgG se pueden determinar mediante la alineación con los residuos de cisteína de la región bisagra de la secuencia de subclase IgG1. La región bisagra es, en general, un módulo dimérico que consiste en dos polipéptidos con secuencia de aminoácidos idéntica. La región bisagra, en general, comprende hasta 25 residuos de aminoácidos y es flexible, lo cual permite que los sitios de unión diana asociados se muevan de manera independiente. La región bisagra se puede subdividir en tres dominios: el dominio bisagra superior, medio e inferior (ver, por ejemplo, Roux, *et al*., J. Immunol. 161 (1998) 4083).

En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos DKTHTCPXCP (SEQ ID NO: 481), en donde X es S o P. En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos HTCPXCP (SEQ ID NO: 482), en donde X es S o P. En un aspecto, la región bisagra tiene la secuencia de aminoácidos CPXCP (SEQ ID NO:483), en donde X es S o P.

Las expresiones "**dominio Fc**" o "región Fc" se usan en la presente para definir una región del extremo C de una cadena pesada de anticuerpo que contiene al menos una porción de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Una región Fc de IgG comprende un dominio CH2 de IgG y un

dominio CH3 de IgG.

El “dominio CH2” de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende de un residuo de aminoácidos a alrededor de la posición 231 de EU a un residuo de aminoácidos a alrededor de la posición 340 de EU (sistema de numeración de EU de acuerdo con Kabat). En un aspecto, un dominio CH2 tiene la secuencia de aminoácidos de APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAK (SEQ ID NO: 478). El dominio CH2 es único en cuanto a que no se aparea estrechamente con otro dominio. En su lugar, dos cadenas de carbohidratos ramificadas ligadas a N se intercalan entre los dos dominios CH2 de una región Fc nativa intacta. Se ha especulado que el carbohidrato podía proporcionar un sustituyente para el apareamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206. En una forma de realización, una cadena de carbohidratos se une al dominio CH2. El dominio CH2 en la presente puede ser un dominio CH2 de una secuencia nativa o dominio CH2 variante.

El “dominio CH3” comprende el tramo de residuos del extremo C a un dominio CH2 en una región Fc indica la parte de un polipéptido de la cadena pesada de anticuerpo que se extiende aproximadamente de la posición 341 de EU a la posición 446 de EU (sistema de numeración de EU de acuerdo con Kabat). En un aspecto, el dominio CH3 tiene la secuencia de aminoácidos de GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO: 479). La región CH3 en la presente puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una “protuberancia” (“botón”) introducida en una cadena de este y una “cavidad” (“ojal”) introducida de manera correspondiente en la otra cadena de este; ver patente estadounidense N.º 5.821.333, que se incorpora expresamente en la presente por referencia). Tales dominios CH3 variantes se pueden usar para promover la heterodimerización de dos cadenas pesadas de anticuerpo no idénticas como se describe en la presente. En una forma de realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. No obstante, la lisina del extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, como se describe en Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

La tecnología de "**botón en ojal**" se describe, por ejemplo, en US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Generalmente, el método implica la introducción de una protuberancia ("botón") en la interfase de un primer polipéptido, y una cavidad correspondiente ("ojal") en la interfase de un segundo polipéptido, de modo tal que la protuberancia se pueda posicionar en la cavidad y, de esta forma, promueva la formación de heterodímeros e impida la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen al reemplazar las cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido al reemplazar cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La protuberancia y la cavidad pueden elaborarse mediante la alteración del ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica de sitio o mediante síntesis de péptidos. En una forma de realización específica, una modificación de botón comprende la sustitución de aminoácidos T366W en una de las dos subunidades del dominio Fc, y la modificación de ojal comprende las sustituciones de aminoácidos T366S, L368A y Y407V en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. En otra forma de realización específica, la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de botón adicionalmente comprende la sustitución de aminoácidos S354C, y la subunidad del dominio Fc que comprende la modificación de ojal adicionalmente comprende la sustitución de aminoácidos Y349C. La introducción de estos dos residuos de cisteína produce la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades de la región Fc, lo que también estabiliza el dímero (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Una "región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina" incluye variantes alélicas naturales de la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que tienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina para mediar las funciones efectoras (tales como citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo). Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden eliminar del extremo N o extremo C de la región Fc de una inmunoglobulina sin pérdida sustancial de la función biológica. Tales variantes se pueden seleccionar de acuerdo con reglas generales conocidas en el estado de la técnica a fin de tener un efecto mínimo sobre la actividad (ver, por ejemplo, Bowie, J. U. *et al*., Science 247:1306-10 (1990)).

La expresión “**dominio Fc de tipo silvestre**” indica una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc natural. Los dominios Fc humanos de tipo silvestre incluyen una región Fc de IgG1 humana nativa (alotipos no A y A), región Fc de IgG2 humana nativa, región Fc de IgG3 humana nativa, y región Fc de IgG4 humana nativa, además de las variantes naturales de estas. Las regiones Fc de tipo silvestre se indican en SEQ ID NO: 484 (IgG1, alotipo caucásico), SEQ ID NO: 485 (IgG1, alotipo afroamericano), SEQ ID NO: 486 (IgG2), SEQ ID NO: 487 (IgG3) y SEQ ID NO:488 (IgG4).

La expresión “**dominio Fc (humano) variante**” indica una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una secuencia de aminoácidos de dominio Fc (humano) “de tipo silvestre” en virtud de al menos una “mutación de aminoácidos”. En un aspecto, la región Fc variante tiene al menos una mutación de aminoácidos en comparación con una región Fc nativa, por ejemplo, de alrededor de una a alrededor de diez mutaciones de aminoácidos, y en un aspecto, de alrededor de una a alrededor de cinco mutaciones de aminoácidos en una región Fc nativa. En un aspecto, la región Fc (variante) tiene al menos alrededor de 95 % de homología con una región Fc de tipo silvestre.

La expresión “**funciones efectoras**” se refiere a aquellas actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión al receptor Fc, citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP), secreción de citocina, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígenos, regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

Las funciones efectoras dependientes de la unión al receptor Fc se pueden mediar por la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores Fc (FcR), que son receptores especializados de superficie celular en células hematopoyéticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulina, y se ha demostrado que median tanto la eliminación de patógenos recubiertos con anticuerpos mediante fagocitosis de complejos inmunitarios, como la lisis de eritrocitos y diversas dianas celulares distintas (por ejemplo, células tumorales) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, mediante citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC) (ver, por ejemplo, Van de Winkel, J.G. y Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524). Los FcR se

definen por su especificidad para los isotipos de inmunoglobulina: Los receptores Fc para anticuerpos de IgG se denominan FcγR. La unión al receptor Fc se describe, por ejemplo, en Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., *et al*., Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., *et al*., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; y Gessner, J.E., *et al*., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248.

La reticulación de los receptores para la región Fc de anticuerpos de IgG (FcγR) desencadena una amplia variedad de funciones efectoras que incluyen fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo y liberación de mediadores inflamatorios, así como depuración de complejos inmunitarios y regulación de la producción de anticuerpos. En los seres humanos, se caracterizaron las siguientes tres clases de FcγR:

- FcγRI (CD64) se une a IgG monomérica con alta afinidad y se expresa en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La modificación en la región Fc de IgG en al menos uno de los residuos de aminoácidos E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) reduce la unión a FcγRI. Los residuos de IgG2 en las posiciones 233–236, sustituidos en IgG1 y IgG4, redujeron 10^3 veces la unión a FcγRI y eliminaron la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos (Armour, K.L., *et al*., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613–2624).

-FcγRII (CD32) se une a IgG en complejo con afinidad media a baja y se expresa ampliamente. Este receptor se puede dividir en dos subtipos, FcγRIIA y FcγRIIB. FcγRIIA se encuentra en muchas células involucradas en la inactivación (por ejemplo, macrófagos, monocitos, neutrófilos) y parece que puede activar el proceso de inactivación. FcγRIIB parece cumplir un rol en los procesos inhibitorios y se encuentra en los linfocitos B, macrófagos y en mastocitos y eosinófilos. En los linfocitos B, parece funcionar para suprimir más la producción de inmunoglobulina y el cambio de los isotipos a, por ejemplo, la clase IgE. En los macrófagos, FcγRIIB actúa para inhibir la fagocitosis mediada a través de FcγRIIA. En los eosinófilos y mastocitos, la forma B puede ayudar a suprimir la activación de estas células a través de la unión de IgE a su receptor separado. Se observa unión reducida para FcγRIIA, por ejemplo, para anticuerpos que comprenden una región Fc de IgG con mutaciones en al menos uno de los residuos de aminoácidos E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414 (numeración de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

-FcγRIII (CD16) se une a IgG con afinidad media a baja y se divide en dos tipos. FcγRIIIA

se encuentra en células NK, macrófagos, eosinófilos y algunos monocitos y linfocitos T y media ADCC. FcγRIIIB se expresa altamente en neutrófilos. Se observa unión reducida a FcγRIIIA, por ejemplo, para anticuerpos que comprenden una región Fc de IgG con mutación en al menos uno de los residuos de aminoácidos E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 y D376 (numeración de acuerdo con el índice de EU de Kabat).

El mapeo de los sitios de unión en IgG1 humana para receptores Fc, los sitios de mutación mencionados anteriormente y los métodos para medir la unión a FcγRI y FcγRIIA se describen en Shields, R.L., *et al*. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

El término "**ADCC**" o la expresión "citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo" es un mecanismo inmunitario que provoca la lisis de células diana recubiertas con anticuerpo mediante células efectoras inmunitarias. Las células diana son células a las cuales se unen específicamente anticuerpos o derivados de estos que comprenden una región Fc, por lo general a través de la parte de la proteína que está en el extremo N con respecto a la región Fc. Como se usa en la presente, la expresión "ADCC reducida" se define como una reducción en la cantidad de células diana que se lisan en un tiempo determinado, con una concentración determinada de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de ADCC definido anteriormente, y/o un aumento en la concentración de anticuerpo en el medio que rodea las células diana, requerido para alcanzar la lisis de una determinada cantidad de células diana en un tiempo determinado, mediante el mecanismo de ADCC. La reducción de ADCC es relativa con respecto a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo producido por el mismo tipo de células huésped, usando los mismos métodos de producción, purificación, formulación y almacenamiento estándar (conocidos por las personas del oficio de nivel medio), pero que no se ha modificado por ingeniería genética. Por ejemplo, la reducción en ADCC mediada por un anticuerpo que comprende en su dominio Fc una sustitución de aminoácidos que reduce ADCC, es relativa a la ADCC mediada por el mismo anticuerpo sin esta sustitución de aminoácidos en el dominio Fc. En el estado de la técnica, se conocen ensayos adecuados para medir la ADCC (ver, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 2006/082515 o la publicación PCT N.º WO 2012/130831). Por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para inducir las etapas iniciales que median la ADCC se investiga mediante la medición de su unión a receptores Fcγ que expresan células, tales como células que expresan de manera recombinante FcγRI y/o FcγRIIA o células NK (que expresan esencialmente FcγRIIIA). En particular, se mide la unión a FcγR en células NK.

Un “**receptor Fc activador**” es un receptor Fc que luego del acoplamiento mediante una región Fc de un anticuerpo produce los eventos de señalización que estimulan la célula que tiene el receptor pata llevar a cabo funciones efectoras. Los receptores Fc activadores incluyen FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32) y FcαRI (CD89). Un receptor Fc activador particular es FcγRIIIa humano (ver UniProt con el número de acceso n.° P08637, versión 141).

Un “**ectodominio**” es el dominio de una proteína de membrana que se extiende en el espacio extracelular (es decir, el espacio fuera de la célula diana). Los ectodominios son normalmente las partes de las proteínas que inician el contacto con las superficies, lo cual provoca la transducción de señal.

La expresión “**ligador peptídico**” se refiere a un péptido que comprende uno o más aminoácidos, normalmente de alrededor de 2 a 20 aminoácidos. Los ligadores peptídicos se conocen en el estado de la técnica o se describen en la presente. Los ligadores peptídicos adecuados no inmunógenos son, por ejemplo, ligadores peptídicos $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ o $G_4(SG_4)_n$, en donde “n” es generalmente un número entre 1 y 5, habitualmente, entre 2 y 4, en particular, 2, es decir, los péptidos seleccionados del grupo que consiste en GGGGS (SEQ ID NO:146) GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147), SGGGGSGGGG (SEQ ID NO:148) y GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO:149), pero también incluyen las secuencias GSPGSSSSGS (SEQ ID NO:150), $(G4S)_3$ (SEQ ID NO:151), $(G4S)_4$ (SEQ ID NO:152), GSGSGSGS (SEQ ID NO:153), GSGSGNGS (SEQ ID NO:154), GGSGSGSG (SEQ ID NO:155), GGSGSG (SEQ ID NO:156), GGSG (SEQ ID NO:157), GGSGNGSG (SEQ ID NO:158), GGNGSGSG (SEQ ID NO:159) y GGNGSG (SEQ ID NO:160). Los ligadores peptídicos de particular interés son (G4S) (SEQ ID NO:146), $(G_4S)_2$ o GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147), $(G4S)_3$ (SEQ ID NO:151) y $(G4S)_4$ (SEQ ID NO:152).

La expresión “**aminoácidos**” como se usa en la presente solicitud indica el grupo de aminoácidos α carboxi naturales que comprenden alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (Arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

“Fusionado" o “conectado” significa que los componentes (por ejemplo, un polipéptido y un ectodominio de dicho miembro de la familia de ligando TNF) están ligados mediante

enlaces peptídicos, ya sea directamente o a través de uno o más ligadores peptídicos.

"**Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos**" con respecto a la secuencia (de proteína) de polipéptidos de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptidos de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, sin tener en cuenta sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras conocidas por las personas del oficio de nivel medio, por ejemplo, usando *software* informático disponible al público, tal como *software* BLAST, BLAST-2, ALIGN, SAWI o Megalign (DNASTAR). Las personas del oficio de nivel medio pueden determinar parámetros adecuados para alinear secuencias, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Sin embargo, a los fines de la presente, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente se presentó junto con la documentación del usuario en la Oficina del Derecho de Autor de los Estados Unidos de América, Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el número de registro del derecho de autor de los Estados Unidos de América TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían. En aquellas situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A con respecto a una determinada secuencia de aminoácidos B (que, de manera alternativa, se puede expresar como una determinada secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, en donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación del programa de A y B, y en donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Cabe destacar que, en donde la longitud de la secuencia de

aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtienen como se describió en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

En algunas formas de realización, se contemplan las **variantes de secuencia de aminoácidos** de las moléculas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de las moléculas de unión al antígeno CD28. Las variantes de secuencia de aminoácidos de las moléculas de unión al antígeno CD28 se pueden preparar al introducir modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas, o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de eliminaciones, inserciones y sustituciones para lograr el constructo final, siempre y cuando el constructo final tenga las características deseadas, por ejemplo, la unión al antígeno. Los sitios de interés para mutagénesis por sustitución incluyen las HVR y regiones estructurales (FR). Se proporcionan sustituciones conservadoras en la tabla B con el título “Sustituciones preferidas” y se describen con mayor detalle más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos (1) a (6). Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en la molécula de interés y los productos se pueden cribar para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión al antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejoradas.

TABLA A

Residuo original	**Sustituciones de ejemplo**	**Sustituciones preferidas**
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu

Residuo original	**Sustituciones de ejemplo**	**Sustituciones preferidas**
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

La expresión "**variantes de secuencia de aminoácidos**" incluye variantes sustanciales en donde existen sustituciones de aminoácidos en uno o más residuos de región hipervariable de una molécula de unión al antígeno de origen (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la/s variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para estudio adicional tendrá(n) modificaciones (por ejemplo, mejoras) en algunas propiedades biológicas (por ejemplo, mayor afinidad, inmunogenicidad reducida) con respecto a la molécula de unión al antígeno de origen y/o conservará(n) sustancialmente algunas propiedades biológicas de la molécula de unión al antígeno de origen. Una variante de sustitución de ejemplo es un anticuerpo madurado por afinidad, que se puede generar de manera conveniente, por ejemplo, mediante técnicas de maduración por afinidad a base de expresión en fago, tales como las descritas en la presente. Brevemente, uno o más residuos de HVR se someten a mutación y las moléculas de unión al antígeno variantes se expresan en fagos y se criban en busca de una actividad biológica en particular (por ejemplo, afinidad de unión). En algunas formas de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad de la molécula de unión al antígeno para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente) en HVR que no reducen sustancialmente la afinidad de unión. Un método útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que puedan dirigirse para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este método, un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) se identifica y reemplaza por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, una estructura de cristal de un complejo de molécula de unión al antígeno-antígeno identifica puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos contiguos pueden ser diana o eliminarse como candidatos para la

sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones del extremo amino y/o carboxilo que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones incluyen moléculas de unión al antígeno CD28 con una fusión al extremo N o C a un polipéptido que aumenta la semivida sérica de las moléculas de unión al antígeno CD28.

En algunas formas de realización, las moléculas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente se alteran para aumentar o disminuir el grado de glucosilación del anticuerpo. Las variantes de glucosilación de las moléculas se pueden lograr de manera conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos a fin de crear o eliminar uno o más sitios de glucosilación. Cuando la molécula de unión a ICOS agonista comprende un dominio Fc, se puede alterar el carbohidrato unido a esta. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero comúnmente comprenden un oligosacárido ramificado biantenario que se une generalmente mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright *et al*. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura del oligosacárido biantenario. En algunas formas de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en moléculas agonistas de unión a ICOS con el fin de crear variantes con determinadas propiedades mejoradas. En un aspecto, se proporcionan variantes de moléculas agonistas de unión a ICOS que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Tales variantes de fucosilación pueden haber mejorado la función de ADCC, ver, por ejemplo las publicaciones de patentes estadounidenses N.^{os} US 2003/0157108 (Presta, L.) o US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Otras variantes de las moléculas de unión al antígeno de CD28 de la invención incluyen aquellas con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en donde un oligosacárido biantenario unido a la región Fc se biseca mediante GlcNAc. Tales variantes pueden tener fucosilación reducida y/o una mejor función de ADCC, ver, por ejemplo, WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al*.); patente estadounidense N.º 6.602.684 (Umana *et al*.); y US 2005/0123546 (Umana *et al*.). También se proporcionan variantes con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Tales variantes de anticuerpos pueden tener una mejor función de CDC y se describen, por ejemplo, en WO

1997/30087 (Patel *et al*.), WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.).

En algunas formas de realización, puede ser conveniente crear **variantes modificadas por ingeniería genética de cisteína** de las moléculas de unión al antígeno CD28 de la invención, por ejemplo, "tioMAb", en donde uno o más residuos de la molécula se sustituyen con residuos de cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles de la molécula. Al sustituir esos residuos con cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otras porciones, tales como porciones de fármacos o porciones de fármaco-ligador, para crear un inmunoconjugado. En algunas formas de realización, uno o más de los siguientes residuos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Las moléculas de unión al antígeno modificadas por ingeniería genética con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 7.521.541.

En algunos aspectos, se puede modificar adicionalmente las moléculas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente para contener porciones no proteicas adicionales que se conocen en el estado de la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Las porciones adecuadas para la derivación del anticuerpo incluyen, entre otros, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitativos de polímeros hidrosolubles en agua incluyen, entre otros, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de estos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en cuanto a su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, de haber más de un polímero unido, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o el tipo de polímeros usados para la derivación puede determinarse en función de consideraciones que incluyen, entre otras, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo biespecífico se usa en un tratamiento en condiciones definidas, etc. En otro aspecto, se proporcionan los conjugados de un anticuerpo y una porción no proteica que se pueden calentar selectivamente mediante

exposición a radiación. En una forma de realización, la porción no proteica es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede tener cualquier longitud de onda, e incluye, entre otras, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan la porción no proteica a una temperatura a la que se destruyen las células cercanas a la porción no proteica del anticuerpo. En otro aspecto, se pueden obtener los inmunoconjugados de las moléculas del antígeno CD28 proporcionadas en la presente. Un "**inmunoconjugado**" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluyen, entre otros, un agente citotóxico.

El término "**polinucleótido**" se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o un constructo, por ejemplo, ARN mensajero (mARN), ARN derivado de virus o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace de amina, tal como el que se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA). La expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a uno o más de los segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Cada nucleótido está compuesto de una base, específicamente, una base de purina o pirimidina (es decir, citosina (C), guanina (G), adenina (A), timina (T) o uracilo (U)), un azúcar (es decir, desoxirribosa o ribosa) y un grupo fosfato. A menudo, la molécula de ácido nucleico se describe mediante la secuencia de bases, en donde dichas bases representan la estructura primaria (estructura lineal) de una molécula de ácido nucleico. La secuencia de bases, en general, se representa de 5' a 3'. En la presente, la expresión "molécula de ácido nucleico" abarca ácido desoxirribonucleico (ADN) que incluye, por ejemplo, ADN complementario (cADN) y ADN genómico, ácido ribonucleico (ARN), en particular, ARN mensajero (mARN), formas sintéticas de ADN o ARN, y polímeros mixtos que comprenden dos o más de estas moléculas. La molécula de ácido nucleico puede ser lineal o circular. Además, la expresión "molécula de ácido nucleico" incluye tanto las cadenas sentido como antisentido, así como formas monocatenarias y bicatenarias. Asimismo, la molécula de ácido nucleico descrita en la presente puede contener nucleótidos naturales o no naturales. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen bases de nucleótidos modificadas con azúcares derivados o enlaces de estructura de fosfato o residuos modificados químicamente. Las moléculas de ácido nucleico también abarcan moléculas de ADN y ARN que son adecuadas como vectores para la expresión directa de un anticuerpo de la invención *in vitro* e/o *in vivo*, por ejemplo, en un huésped o paciente. Dichos vectores de ADN (por ejemplo, cADN) o ARN (por ejemplo, mARN)

pueden ser modificados o no modificados. Por ejemplo, mARN se puede modificar químicamente para mejorar la estabilidad del vector de ARN y/o la expresión de la molécula codificada de modo que mARN se puede inyectar en un sujeto para generar el anticuerpo *in vivo* (ver, por ejemplo, Stadler *et al*. (2017) Nature Medicine 23:815-817, o EP 2 101 823 B1).

Molécula de ácido nucleico o polinucléotido "**aislado**" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se retiró de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un polipéptido contenido en un vector se considera aislado a los fines de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Un polinucleótido aislado incluye una molécula de polinucleótido contenida en células que, en general, contienen la molécula de polinucleótido, pero la molécula de polinucleótido está presente de manera extracromosómica o en una ubicación cromosómica que es diferente de la ubicación cromosómica natural. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcriptos de ARN *in vivo* o *in vitro* de la presente invención, así como formas monocatenarias positivas y negativas, y formas bicatenarias. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención también incluyen tales moléculas producidas de manera sintética. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, sitio de unión al ribosoma, o un terminador de transcripción.

Un ácido nucleico o polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención se refiere a que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse con otro nucleótido, o una cantidad de nucleótidos hasta 5 % del total de nucleótidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones del extremo 5’ o 3’ de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre dichas posiciones del extremo intercalados de manera individual entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de

referencia. Prácticamente, se puede determinar de manera convencional si cualquier secuencia de polinucleótidos en particular es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención usando programas informáticos conocidos, tales como los analizados anteriormente para los polipéptidos (por ejemplo, ALIGN-2).

La expresión "**casete de expresión**" se refiere a un polinucleótido generado de manera recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificado que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plástido, virus, o fragmento de ácido nucleico. En general, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se debe transcribir y un promotor. En algunas formas de realización, el casete de expresión de la invención comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la invención o fragmentos de esta.

El término "**vector**" o la expresión "vector de expresión" es un sinónimo de "constructo de expresión" y se refiere a una molécula de ADN que se usa para introducir y dirigir la expresión de un gen específico al cual se asocia operativamente en una célula diana. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico de autorreplicación así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se introdujo. El vector de expresión de la presente invención comprende un casete de expresión. Los vectores de expresión permiten la transcripción de grandes cantidades de mARN estable. Una vez que el vector de expresión está dentro de la célula diana, la molécula o proteína de ácido ribonucleico que es codificada por el gen se produce mediante la transcripción celular y/o mecanismo de traducción. En una forma de realización, el vector de expresión de la invención comprende un casete de expresión que comprende secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la invención o fragmentos de esta.

Las expresiones "**célula huésped**", "línea de células huésped" y "cultivo de células huésped" se usan de manera indistinta y se refieren a células en las que se ha introducido un ácido nucleico exógeno, que incluye la progenie de tales células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de estas, independientemente de la cantidad de pasajes. La progenie puede no ser idéntica por completo en el contenido de

ácido nucleico con respecto a una célula de origen, sino que puede contener mutaciones. En la presente se incluyen progenies mutantes que tienen la misma función o actividad biológica que se identifica o selecciona en la célula transformada originalmente. Una célula huésped es cualquier tipo de sistema celular que se puede usar para generar las moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la presente invención. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo células cultivadas de mamífero, tales como células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de insecto, y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, una planta transgénica o planta cultivada o tejido animal.

Una "**cantidad eficaz**" de un agente se refiere a la cantidad que es necesaria para producir un cambio fisiológico en la célula o tejido al que se administra.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un agente, por ejemplo, una composición farmacéutica, se refiere a una cantidad que es eficaz, en dosis y por períodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, por ejemplo, elimina, disminuye, retrasa, minimiza o previene efectos adversos de una enfermedad.

Un "**individuo**" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En particular, el individuo o sujeto es un ser humano.

La expresión "**composición farmacéutica**" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se le administraría la formulación.

Un "**excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico**" se refiere a un ingrediente en una composición farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico incluye, entre otros, un amortiguador, un estabilizante o un conservante.

La expresión "**prospecto**" se refiere a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre

indicaciones, uso, dosis, administración, tratamiento conjunto, contraindicaciones y/o advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

Como se usa en la presente, "**tratamiento**" (y sus variaciones gramaticales tales como "tratar" o "que trata") se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo que se está tratando y se puede llevar a cabo para profilaxis o durante el curso de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, entre otros, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o prognosis mejorada. En algunas formas de realización, las moléculas de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o ralentizar la progresión de una enfermedad.

La expresión "**tratamiento conjunto**" o "**coadministración**" como se usa en la presente abarca la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o distintas formulaciones) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un anticuerpo como se informa en la presente puede llevarse a cabo antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales, preferentemente un anticuerpo o anticuerpos.

"**Trastorno proliferativo de linfocitos B**" se refiere a una enfermedad en donde la cantidad de linfocitos B en un paciente aumenta en comparación con la cantidad de linfocitos B en un sujeto sano y, en particular, en donde el aumento de la cantidad de linfocitos B es la causa o característica distintiva de la enfermedad.

La expresión "**cáncer hematológico**" se refiere a o describe el estado fisiológico en mamíferos que generalmente se caracteriza por crecimiento/proliferación celular no regulados. Por lo tanto, como se usa en la presente, el término "cáncer" se refiere a enfermedades proliferativas, tales como carcinoma, linfomas (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano), blastoma, sarcoma y leucemia. En particular, el término "cáncer" se refiere a un trastorno proliferativo de linfocitos B. En un aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (HL).

El término "**cáncer**" se refiere a o describe el estado fisiológico en mamíferos que

generalmente se caracteriza por crecimiento/proliferación celular no regulados. Por lo tanto, como se usa en la presente, el término “cáncer” se refiere a enfermedades proliferativas, tales como carcinoma, linfomas (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no hodgkiniano), blastoma, sarcoma y leucemia. En particular, el término “cáncer” incluye leucemia linfocítica, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioloalveolares, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de las glándulas suprarrenales, sarcoma del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma del tronco encefálico, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwanomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinomas de células escamosas, adenoma de la glándula pituitaria y sarcoma de Ewing, que incluye las versiones resistentes al tratamiento de cualquiera de los tipos de cáncer anteriores, o una combinación de uno o más de los tipos de cáncer anteriores. En un aspecto, el cáncer es un tumor sólido. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer hematológico, en particular, leucemia, con máxima particularidad, leucemia linfoblástica aguda (ALL) o leucemia mieloide aguda (AML).

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención

La invención proporciona moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 novedosas con propiedades particularmente ventajosas, tales como producibilidad, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia de direccionamiento, toxicidad reducida, un rango de dosis extenso que puede administrarse al paciente y, por lo tanto, posiblemente una mejor eficacia. Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 novedosas comprenden un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora (Fc silencioso) y, por lo tanto, se evita la reticulación inespecífica mediante receptores Fc. En cambio, estos comprenden

al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor tal como proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA), que causa reticulación en la región del tumor. Por lo tanto, se logra la activación de linfocitos T específica de tumor.

En la presente, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 con unión monovalente a CD28, que comprende

(a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio Fc es una IgG, en particular, un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En un aspecto particular, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable es un dominio Fc de IgG1. El dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o reducen o eliminan la función efectora. En un aspecto, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, el dominio Fc es de subclase IgG1 humana y comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable, en donde la primera subunidad comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:176 y la segunda subunidad comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:177.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25.

Además, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende las CDR de la región variable de la cadena pesada (VHCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 489, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 490, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 491, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 492, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 493 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 494.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53. En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 495, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 496, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 497, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende

una CDR-L1 de SEQ ID NO: 498, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 499 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 500.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende las CDR de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y las CDR de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27. En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 501, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 502, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 503, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 504, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 505 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 506.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:61.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 se une a CD28 con una afinidad reducida en comparación con un dominio de unión

al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27. La afinidad se mide mediante citometría de flujo como la unión a células CHO que expresan CD28. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 se une a CD28 con una afinidad reducida en comparación con un dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, que comprende la CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y la CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 con afinidad reducida en comparación con un dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53.

En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre CEA

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno carcinoembrionario (CEA).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:188, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:189, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:190, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:191, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:192, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:193, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:180, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:181, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:182, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:183, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:184, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:185, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:128, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:130, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:131, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132, o

(iv) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:507, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:508, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:509, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:510, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:511, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:512.

En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 188, una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 189, y una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 190, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 191, una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 192, y una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 193.

Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:134. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO:134.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:513, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:514. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:513, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:514.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:194 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:195, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:196 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:197, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:198 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:199, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:202 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:203, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:204 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:205, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:206 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:207, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:208 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:209, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:210 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:211, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:212 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:213.

Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre FAP

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a la proteína de activación de fibroplastos (FAP).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

En particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre EpCAM

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a la molécula de adhesión a la célula epitelial (EpCAM).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:515, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:516, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:517, y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:518, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:519, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:520. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %,

99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521, y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a EpCAM comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521 y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre HER3

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:523, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:524, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:525, y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:526, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:527, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:528. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529, y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a HER3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529 y una

región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre CD30

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:531, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:532, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:533, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:534, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:535, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:536. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD30 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre TBPG (5T4)

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno

CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG (5T4).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:539, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:540, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:541, y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:542, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:543, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:544. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545, y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a TBPG comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTBPG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545 y una región variable de la cadena liviana (V_LTBPG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre MM

La invención también proporciona moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 novedosas que son particularmente útiles en el tratamiento de mieloma múltiple. Las moléculas comprenden al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM) que causa reticulación en presencia de células que expresan antígeno de superficie celular de MM y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc

y/o función efectora (Fc silencioso). Por lo tanto, se evita la reticulación inespecífica mediante receptores Fc y se logra la activación específica de linfocitos T en presencia de células que expresan antígeno de superficie celular de MM.

Por lo tanto, en la presente se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM), y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora. En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente se caracteriza por la unión monovalente a CD28. En un aspecto adicional, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente se caracteriza por la unión monovalente al antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio Fc es una IgG, en particular, un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En un aspecto particular, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable es un dominio Fc de IgG1. El dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o reducen o eliminan la función efectora. En un aspecto, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, el dominio Fc es de subclase IgG1 humana y comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el antígeno de superficie celular de MM se selecciona del grupo que consiste en CD38, BCMA y GPRC5D.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:547, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:548, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:549, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:550, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:551, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:552. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD38 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554.

Aun en otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:555, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:556, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:557, y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:558, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:559, y

(vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:560. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:561, y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:562. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a BCMA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:561 y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:562.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre GPRC5D

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:563, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:564, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:565, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:566, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:567, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:568.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ

ID NO:569, SEQ ID NO:571, SEQ ID NO:572 y SEQ ID NO:573 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:570, SEQ ID NO:574, SEQ ID NO:575, SEQ ID NO:576, SEQ ID NO:577 y SEQ ID NO:578.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:579, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:580, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:581, y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:582, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:583, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:584.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 585, SEQ ID NO: 586, SEQ ID NO: 587, SEQ ID NO: 588, SEQ ID NO: 589 y SEQ ID NO:590 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 591, SEQ ID NO: 592, SEQ ID NO: 593, SEQ ID NO: 594 y SEQ ID NO: 595.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a GPRC5D comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:573 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:576, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:572, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:586 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:593, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:587 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:592.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 monovalentes para la unión a CD28 y monovalentes para la unión al antígeno asociado al tumor (formato 1+1)

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CEA, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88 (molécula M).

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a FAP, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:66, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:67 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 (molécula C).

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:79 (molécula H).

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un dominio VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en donde uno de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado

al tumor se fusionan mediante un ligador peptídico al extremo C de la primera subunidad del dominio Fc y el otro de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona mediante un ligador peptídico al extremo C de la segunda subunidad del dominio Fc.

En un aspecto, el ligador peptídico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:151 y SEQ ID NO:152. Más en particular, el ligador peptídico comprende la SEQ ID NO:152.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:62, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:72, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:80 (molécula I).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54,

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CEA, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:513 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:514,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:352, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:351, una segunda cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:353 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:354 (molécula 11A). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:352, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:351, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:355 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11B). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:352, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:351, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358 (molécula 11C). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:352, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:351, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:359 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:354 (molécula 11D). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:370, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:369, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:353 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11I). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:370, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:369, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:359 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:354 (molécula 11J). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:370, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:369, una segunda cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358 (molécula 11K). En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:370, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:369, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:359 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11L). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:376, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:375, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358 (molécula 11R). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:376, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:375, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:355 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11S). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:376, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:375, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:355 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:354 (molécula 11T).

En un aspecto particular, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:376, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:375, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:355 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11S). En otro aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:352, una primera cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:351, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:355 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:356 (molécula 11B).

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CEA, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CEA, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:513 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:514,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:360, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:362 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:363 (molécula 11E). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:360, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:364 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:365 (molécula 11F). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:360, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:366 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:367 (molécula 11G). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:360, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:368 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:363 (molécula 11H). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:372, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:371, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:368 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:363 (molécula 11M). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:372, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:371, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:366 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:367 (molécula 11N). En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:372, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:371, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:364 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:365 (molécula 11O).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a EpCAM, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de

lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a EpCAM que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521 y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a EpCAM, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos

que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a EpCAM que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:521 y una región variable de la cadena liviana (V_LEpCAM) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:522,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:367, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:366, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:390 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:391 (molécula 14A).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno

CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a HER3, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a HER3 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529 y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO:357, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:392 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:393 (molécula 14B).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a HER3, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a HER3 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:529 y una región variable de la cadena liviana (V_LHER3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:530,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD30, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD30 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de

lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:394 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:395 (molécula 14C).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD30, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD30 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:537 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD30) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:538,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a TPBG, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a TPBG que

comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTPBG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545 y una región variable de la cadena liviana (V_LTPBG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:396 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:397 (molécula 14D).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a TPBG, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a TPBG que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HTPBG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:545 y una región variable de la cadena liviana (V_LTPBG) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:546,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD38, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD38 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:357, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:358, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:400 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:401 (molécula 16C).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD38, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD38 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:553 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD38) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:554,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a BCMA, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a BCMA que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:561 y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:562,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a BCMA, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a BCMA que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:561 y una región variable de la cadena liviana (V_LBCMA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:562,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:367, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:366, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:402 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:403 (molécula 16D).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a GPRC5D, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno

CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a GPRC5D que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:365, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:364, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:398 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:399 (molécula 16B).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a GPRC5D, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a GPRC5D que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:569 y una región variable de la cadena liviana (V_LGPRC5D) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:570,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:367, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:366, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:398 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:399 (molécula 16A).

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 monovalentes para la unión a CD28 y bivalentes para la unión al antígeno asociado al tumor (formato 1+2)

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se divulga en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del domino Fc, y el tercer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende dos cadenas livianas, en donde cada una comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 (molécula G).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un fragmento capaz de unirse de manera específica a CEA, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:186 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:187, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:200 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:201, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:513 y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:514,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende dos cadenas livianas, en donde cada una comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:368, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:362, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:373 (molécula 11P).

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende dos cadenas livianas, en donde cada una comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:361, una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:368, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:360, y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:374 (molécula 11Q).

Moléculas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre FAP y CEA

En la presente, también se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 con unión monovalente a CD28, que comprende

(a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, caracterizadas por comprender adicionalmente un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un segundo antígeno asociado al tumor.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula triespecífica agonista de unión al antígeno CD28 con unión monovalente a CD28, que comprende

(a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA y un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP,

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:87, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:388 y una segunda cadena

liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:389 (molécula Y).

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre antígeno de superficie de linfocitos B

La invención proporciona moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 novedosas con propiedades particularmente ventajosas, tales como producibilidad, estabilidad, afinidad de unión, actividad biológica, eficacia de direccionamiento, toxicidad reducida, un rango de dosis extenso que puede administrarse al paciente y, por lo tanto, posiblemente una mejor eficacia. Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 novedosas comprenden un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora (Fc silencioso) y, por lo tanto, se evita la reticulación inespecífica mediante receptores Fc. En cambio, comprenden al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, tal como CD19 o CD79b, que genera reticulación en presencia de linfocitos B que expresan CD19 o CD79b. Por lo tanto, se logra la activación específica de linfocitos T en presencia de linfocitos B que expresan CD19 o CD79b.

En la presente se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora. En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente se caracteriza por la unión monovalente a CD28. En un aspecto adicional, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente se caracteriza por la unión monovalente al antígeno de superficie de linfocitos B.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio Fc es una IgG, en particular, un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4. En un aspecto particular, el dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr

una asociación estable es un dominio Fc de IgG1. El dominio Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o reducen o eliminan la función efectora. En un aspecto, el dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto, el dominio Fc es de subclase IgG1 humana y comprende las mutaciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO:20, una CDR-H2 de SEQ ID NO:21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO:22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO:23, una CDR-L2 de SEQ ID NO:24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO:25. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %

o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 28, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 29, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 30, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 31, una CDR-L2 de SEQ ID NO:32 y una CDR-L3 de SEQ ID NO:33. En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35.

En otro aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47,

SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:61.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27. En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53. En otro aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la

cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54. En un aspecto particular adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27. Aun en otro aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:406, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:407, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:408, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:409, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:410, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:411, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:414, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:415, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:416, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:417, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:418, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:419. Particularmente, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende (a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de

aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413, o (b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:420, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:421. En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:422, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:423, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:424, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:425, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:426, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:427. En particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429. En un aspecto, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429.

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se definió en la presente anteriormente, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 es un fragmento Fab o un fragmento crossFab. En un aspecto particular, el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 es un fragmento Fab y el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B es un fragmento crossFab.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 monovalentes para la unión a CD28 y monovalentes para la unión a un antígeno de superficie de linfocitos B (formato 1+1)

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD19, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD19, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:420 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:421,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:118, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:430 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:431 (molécula 18A).

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:121, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:116, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:430 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:431 (molécula 18B).

En otro aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:122, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:114, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:430 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:431 (molécula 18C).

En un aspecto adicional, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:65, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:114, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:430 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:431 (molécula 18D).

Aun en otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:123, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:118, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:430 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:431 (molécula 18E).

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD19, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD19, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:420 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:421,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD79b, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD79b que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto particular, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende una primera cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:121, una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:116, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:432 y una segunda cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:433 (molécula 18F).

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD19, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente, que comprende

(a) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a CD28, que comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(iii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27,

(b) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD79b que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429,

y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

Moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 monovalentes para la unión a CD28 y bivalentes para la unión a un antígeno de superficie de linfocitos B (formato 1+2)

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se caracteriza por la unión bivalente al antígeno de superficie de linfocitos B.

En otro aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se divulga en la presente, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del domino Fc, y el tercer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

Modificaciones del dominio Fc que reducen la unión del receptor Fc y/o la función efectora

El dominio Fc de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención consiste en un par de cadenas de polipéptidos que comprenden dominios de cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Por ejemplo, el dominio Fc de una molécula de inmunoglobulina G (IgG) es un dímero, cada subunidad de esta comprende los dominios constantes de la cadena pesada CH2 y CH3 de IgG. Las dos subunidades del dominio Fc son capaces de asociarse de forma estable entre sí. El dominio Fc confiere propiedades farmacocinéticas favorables a las moléculas de unión al antígeno de la invención, que incluyen una semivida en suero larga, lo que contribuye a una buena

acumulación en el tejido diana y una relación de distribución tejido-sangre favorable. Por otro lado, no obstante, puede conducir al direccionamiento indeseable de los anticuerpos biespecíficos de la invención hacia las células que expresan receptores Fc en lugar de las células que portan el antígeno preferidas.

En consecuencia, el dominio Fc de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención presenta una afinidad de unión reducida a un receptor Fc y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG1 nativo. En un aspecto, el Fc no se une sustancialmente a un receptor Fc y/o no induce la función efectora. En un aspecto particular, el receptor Fc es un receptor Fcγ. En un aspecto, el receptor Fc es un receptor Fc humano. En un aspecto específico, el receptor Fc es un receptor Fcγ activador humano, más específicamente, FcγRIIIa, FcγRI o FcγRIIa humano, aun más específicamente, FcγRIIIa humano. En un aspecto, el dominio Fc no induce la función efectora. La función efectora reducida puede incluir, entre otras, una o más de las siguientes: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida, citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC) reducida, fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) reducida, secreción de citocina reducida, absorción de antígenos mediada por el complejo inmunitario mediante células presentadoras de antígenos reducida, unión a células NK reducida, unión a macrófagos reducida, unión a monocitos reducida, unión a células polimorfonucleares reducida, señalización directa que induce la apoptosis reducida, maduración de células dendríticas reducida o cebado de linfocitos T reducido.

En determinados aspectos, se puede introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente y, de esta manera, generar una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En un aspecto particular, la invención proporciona una molécula de unión al antígeno, en donde la región Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc, en particular, con respecto a un receptor Fcγ. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, en donde la región Fc comprende una o más sustituciones de aminoácidos y en donde la ADCC inducida por el anticuerpo se reduce a 0-20 % de la ADCC inducida por un anticuerpo que comprende la región Fc de IgG1 humana de tipo silvestre.

En un aspecto, el dominio Fc de la molécula de unión al antígeno de la invención comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión del dominio Fc por un Fc receptor y/o función efectora. En general, las mismas una o más mutaciones de aminoácidos están presentes en cada una de las dos subunidades del dominio Fc. En particular, el dominio Fc comprende una sustitución de aminoácido en una posición de E233, L234, L235, N297, P331 y P329 (numeración EU). En particular, el dominio Fc comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y/o 329 (numeración EU) de las cadenas pesadas de IgG. Más en particular, se proporciona una molécula de unión al antígeno de acuerdo con la invención, que comprende un dominio Fc con las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G ("P329G LALA", numeración EU) en las cadenas pesadas de IgG. Las sustituciones de aminoácidos L234A y L235A se refieren a la mutación denominada LALA. La combinación de sustituciones de aminoácidos "P329G LALA" elimina casi por completo la unión del receptor Fcγ de un dominio Fc de IgG1 humano y se describe en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2012/130831 A1, que también describe métodos de preparación de tales dominios Fc mutantes y métodos para determinar sus propiedades, tales como unión al receptor Fc o funciones efectoras.

Los dominios Fc con unión al receptor Fc y/o función efectora reducidas también incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos del dominio Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense N.° 6.737.056). Dichos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, que incluyen el mutante Fc denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 por alanina (patente estadounidense N.° 7.332.581).

En otro aspecto, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4. Los anticuerpos de IgG4 presentan afinidad de unión reducida por los receptores Fc y funciones efectoras reducidas en comparación con los anticuerpos de IgG1. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende una sustitución de aminoácidos en la posición S228 (numeración de Kabat), en particular, la sustitución de aminoácidos S228P. En un aspecto más específico, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG4 que comprende las sustituciones de aminoácidos L235E y S228P y P329G (numeración EU). Tales mutantes de los dominios Fc de IgG4 y las propiedades de unión del receptor Fcγ también se describen en WO 2012/130831.

Los dominios Fc mutantes pueden prepararse mediante eliminación, sustitución, inserción o modificación de aminoácidos, usando métodos genéticos o químicos conocidos en el

estado de la técnica. Los métodos genéticos pueden incluir mutagénesis específica de sitio de la secuencia de ADN codificante, PCR, síntesis génica y similares. Los cambios de nucleótidos correctos pueden verificarse, por ejemplo, mediante secuenciación.

La unión a receptores Fc puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante ELISA o mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando instrumentos estándar, tal como un instrumento BIAcore (GE Healthcare), y receptores Fc, tales como los que se pueden obtener mediante expresión recombinante. De manera alternativa, la afinidad de unión de los dominicos Fc o los anticuerpos de activación celular que comprenden un dominio Fc para receptores Fc se puede evaluar usando líneas celulares conocidas por expresar receptores Fc particulares, tales como células NK humanas que expresan el receptor FcγIIIa.

La función efectora de un dominio Fc, o las moléculas de unión al antígeno de la invención que comprenden un dominio Fc, pueden medirse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. En la presente, se describe un ensayo adecuado para medir la ADCC. Otros ejemplos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describen en la patente estadounidense N.º 5.500.362; Hellstrom *et al*. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) y Hellstrom *et al*., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); la patente estadounidense N.º 5.821.337; Bruggemann *et al*., J. Exp Med 166, 1351-1361 (1987). De manera alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA); y el ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® no radiactivo (Promega, Madison, WI)). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células *Natural Killer* (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el que se divulga en Clynes *et al*. Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

En algunos aspectos, la unión del dominio Fc a un componente del complemento, específicamente a C1q, se reduce. En consecuencia, en algunos aspectos en donde el dominio Fc está modificado por ingeniería genética para tener función efectora reducida, dicha función efectora reducida incluye CDC reducida. Se pueden realizar ensayos de unión a C1q para determinar si los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse a C1q y, por lo tanto, si tienen actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del

complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al*., J Immunol Methods 202:163 (1996); Cragg *et al*., Blood 101, 1045-1052 (2003); y Cragg y Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)).

En un aspecto particular, el dominio Fc que presenta afinidad de unión reducida por un receptor Fc receptor y/o función efectora reducida, en comparación con un dominio Fc de IgG1 nativo, es un dominio Fc de IgG1 humano que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y, opcionalmente, P329G, o un dominio Fc de IgG4 humano que comprende las sustituciones de aminoácidos S228P, L235E y, opcionalmente, P329G (numeraciones de acuerdo con el índice EU de Kabat). Más en particular, es un dominio Fc de IgG1 humano que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones del dominio Fc que promueven la heterodimerización

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención comprenden diferentes sitios de unión al antígeno fusionados a una u otra de las dos subunidades del dominio Fc; de esta manera, las dos subunidades del dominio Fc pueden estar incluidas en dos cadenas de polipéptidos no idénticas. La coexpresión recombinante de estos polipéptidos y la posterior dimerización conducen a diversas combinaciones posibles de los dos polipéptidos. Para mejorar el rendimiento y la pureza de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la invención en producción recombinante, será conveniente, por lo tanto, introducir en el dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la invención una modificación que promueva la asociación de los polipéptidos deseados.

En consecuencia, en aspectos particulares, la invención se refiere a la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 con unión monovalente a CD28, que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno asociado al tumor, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, en donde el dominio Fc comprende una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc. El sitio de mayor interacción proteína-proteína entre las dos subunidades de un dominio Fc de IgG humano se encuentra en el dominio CH3 del

dominio Fc. Por lo tanto, en un aspecto, dicha modificación está en el dominio CH3 del dominio Fc.

En un aspecto específico, dicha modificación es una modificación denominada “botón en ojal”, que comprende una modificación de “botón” en una de las dos subunidades del dominio Fc y una modificación de "ojal" en la otra de las dos subunidades del dominio Fc. Por lo tanto, la invención se refiere a la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 con unión monovalente a CD28, que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno asociado al tumor, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, en donde la primera subunidad del dominio Fc comprende botones y la segunda subunidad del dominio Fc comprende ojales de acuerdo con el método botón en ojal. En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S y Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

La tecnología de botón en ojal se describe, por ejemplo, en US 5.731.168; US 7.695.936; Ridgway *et al.*, Prot Eng 9, 617-621 (1996) y Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Generalmente, el método implica la introducción de una protuberancia (“botón”) en la interfase de un primer polipéptido, y una cavidad correspondiente (“ojal”) en la interfase de un segundo polipéptido, de modo tal que la protuberancia se pueda posicionar en la cavidad y, de esta forma, promueva la formación de heterodímeros e impida la formación de homodímeros. Las protuberancias se construyen al reemplazar las cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean cavidades compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido al reemplazar cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina).

En consecuencia, en un aspecto, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno de la invención, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral mayor. De esta manera, se genera una protuberancia dentro del dominio CH3 de

la primera subunidad, que se puede posicionar en una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad y, en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, se reemplaza un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido que tiene un volumen de cadena lateral menor. De esta manera, se genera una cavidad dentro del dominio CH3 de la segunda subunidad, dentro de la que se puede posicionar la protuberancia dentro del dominio CH3 de la primera subunidad. La protuberancia y la cavidad pueden elaborarse mediante la alteración del ácido nucleico que codifica los polipéptidos, por ejemplo, mediante mutagénesis específica de sitio o mediante síntesis de péptidos. En un aspecto específico, en el dominio CH3 de la primera subunidad del dominio Fc, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de triptófano (T366W), y en el dominio CH3 de la segunda subunidad del dominio Fc, el residuo de tirosina en la posición 407 se reemplaza con un residuo de valina (Y407V). En un aspecto, en la segunda subunidad del dominio Fc, además, el residuo de treonina en la posición 366 se reemplaza con un residuo de serina (T366S) y el residuo de leucina en la posición 368 se reemplaza con un residuo alanina (L368A).

Aun en otro aspecto, en la primera subunidad del dominio Fc, además, el residuo de serina en la posición 354 se reemplaza con un residuo de cisteína (S354C), y en la segunda subunidad del dominio Fc, además, el residuo de tirosina en la posición 349 se reemplaza con un residuo de cisteína (Y349C). La introducción de estos dos residuos de cisteína produce la formación de un puente disulfuro entre las dos subunidades del dominio Fc, lo que también estabiliza el dímero (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). En un aspecto particular, la primera subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos S354C y T366W (numeración EU) y la segunda subunidad del dominio Fc comprende las sustituciones de aminoácidos Y349C, T366S y Y407V (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

En un aspecto alternativo, una modificación que promueve la asociación de la primera y la segunda subunidad del dominio Fc comprende una modificación que media efectos de conducción electrostática, por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2009/089004. Generalmente, este método implica el reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos en la interfase de las dos subunidades del dominio Fc mediante residuos de aminoácidos cargados, para que la formación de homodímeros se vuelva electrostáticamente desfavorable, pero la heterodimerización electrostáticamente favorable.

El extremo C de la cadena pesada de la molécula biespecífica agonista de unión al

antígeno CD28 como se informa en la presente puede ser un extremo completo del extremo C con los residuos PGK de aminoácidos. El extremo C de la cadena pesada puede ser un extremo C acortado en donde se removieron uno o dos de los residuos de aminoácidos del extremo C. En un aspecto preferido, el extremo C de la cadena pesada es un extremo P del extremo C acortado. En un aspecto preferido, el extremo C de la cadena pesada es un extremo PG del extremo C acortado. En un aspecto de todos los aspectos que se informan en la presente, una molécula de unión al antígeno CD28 que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 del extremo C, como se especifica en la presente, comprende un dipéptido de glicina-lisina del extremo C (G446 y K447, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat). En un aspecto de todos los aspectos que se informan en la presente, una molécula de unión al antígeno CD28 que comprende una cadena pesada que incluye un dominio CH3 del extremo C, como se especifica en la presente, comprende un residuo de glicina del extremo C (G446, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

Modificaciones en los dominios Fab

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28 que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, en donde el al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un fragmento Fab y, en el fragmento Fab, los dominios variables VH y VL o los dominios constantes CH1 y CL se intercambian de acuerdo con la tecnología Crossmab.

Los anticuerpos multiespecíficos con un reemplazo/intercambio de dominio en un brazo de unión (CrossMabVH-VL o CrossMabCH-CL) se describen en detalle en WO2009/080252 y Schaefer, W. *et al*, PNAS, 108 (2011) 11187-1191. Estos reducen claramente los subproductos causados por el error de apareamiento de una cadena liviana contra un primer antígeno con la cadena pesada incorrecta contra el segundo antígeno (en comparación con métodos sin dicho intercambio de dominio).

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula biespecífica agonista de unión al

antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28 que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, en donde, en los fragmentos Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, los dominios constantes CL y CH1 se reemplazan entre sí de modo que el dominio CH1 forme parte de la cadena liviana y el dominio CL forme parte de la cadena pesada.

En otro aspecto, y para mejorar aun más el apareamiento correcto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28 que comprende (a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, (b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor y (c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora, puede contener diferentes sustituciones de aminoácidos cargados (denominados “residuos cargados”). Estas modificaciones se introducen en los dominios CH1 y CL entrecruzados y no entrecruzados. En un aspecto particular, la invención se refiere a una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28, en donde, en uno de los dominios CL, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se reemplazó por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se sustituyó por lisina (K), y en donde, en uno de los dominios CH1, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración EU) se sustituyeron por ácido glutámico (E). En un aspecto particular, en el dominio CL del fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) se reemplazó por arginina (R) y el aminoácido en la posición 124 (numeración EU) se sustituyó por lisina (K), y en el dominio CH1 del fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28, los aminoácidos en la posición 147 (numeración EU) y en la posición 213 (numeración de EU) se sustituyeron por ácido glutámico (E).

Polinucleótidos

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente o un fragmento de esta. El uno o más polinucleótidos aislados que codifican la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden expresar como un polinucleótido único que codifica la totalidad de la molécula de unión al antígeno o como polinucleótidos múltiples (por ejemplo, dos o más) que se coexpresan. Los polipéptidos codificados por polinucleótidos que están coexpresados se pueden asociar a través de, por ejemplo, puentes disulfuro u otros medios para formar una molécula de unión al antígeno funcional. Por ejemplo, la porción de la cadena liviana de una inmunoglobulina puede codificarla un polinucleótido separado de la porción de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Cuando se coexpresan, los polipéptidos de la cadena pesada se asocian con los polipéptidos de la cadena liviana para formar la inmunoglobulina. En algunos aspectos, el polinucleótido aislado codifica la totalidad de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención como se describe en la presente. En otros aspectos, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido incluido en la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de acuerdo con la invención como se describe en la presente. En determinados aspectos, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En otros aspectos, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en la forma de ARN mensajero (mARN). El ARN de la presente invención puede ser monocatenario o bicatenario.

Métodos recombinantes

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en estado sólido (por ejemplo, síntesis en fase sólida de Merrifield) o producción recombinante. Para la producción recombinante, se aísla uno o más polinucleótidos que codifican la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 o los fragmentos de polipéptidos de esta, por ejemplo, como se describe anteriormente, y se los inserta en uno o más vectores para una clonación y/o expresión adicionales en una célula huésped. Tal polinucleótido puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales. En un aspecto de la invención, se proporciona un vector, preferentemente un vector de expresión, que comprende uno o más de los polinucleótidos de la invención. Se pueden usar métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio para construir vectores de expresión que contengan la secuencia codificante del anticuerpo (fragmento) junto con

señales adecuadas de control de la transcripción/traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación *in vivo*/recombinación genética. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); y Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989). El vector de expresión puede ser parte de un plásmido o virus o puede ser un fragmento de ácido nucleico. El vector de expresión incluye un casete de expresión en el que se clona el polinucleótido que codifica el anticuerpo o los fragmentos de polipéptido de este (es decir, la región codificante) en asociación operativa con un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción. Como se usa en la presente, “una región codificante” es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Si bien un “codón de detención” (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse parte de una región codificante, si está presente, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores transcripcionales, intrones, regiones no traducidas 5' y 3' y similares, no es parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes pueden estar presentes en un solo constructo de polinucleótido, por ejemplo, en un solo vector, o en constructos de polinucleótidos separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un vector de la presente invención puede codificar uno o más polipéptidos, que se separan de manera posterior a la traducción o en conjunto con esta en las proteínas finales mediante escisión proteolítica. Asimismo, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas con un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o los fragmentos de polipéptido de este, o las variantes o derivados de estos. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, entre otros, elementos o motivos especializados, tal como un péptido de señal secretora o un dominio funcional heterólogo. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de modo que la expresión del producto génico sea influenciada o controlada por la/s secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con esta) están “asociados operativamente” si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del mARN que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias

reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad de transcripción de la plantilla de ADN. Por lo tanto, una región promotora estaría asociada operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fue capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células.

En la presente se divulgan promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción. Las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, entre otras, regiones de control de la transcripción, que funcionan en células de vertebrados, tales como, por ejemplo, segmentos de promotores y mejoradores de citomegalovirus (por ejemplo, el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus del simio 40 (por ejemplo, el promotor temprano) y retrovirus (tales como, por ejemplo, el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrado tales como actina, proteína de choque térmico, hormona del crecimiento bovino y â-globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido así como promotores inducibles (por ejemplo, promotores inducibles por tetraciclinas). De manera similar, las personas del oficio de nivel medio conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Estos incluyen, entre otros, sitios de unión al ribosoma, codones de inicio y terminación de la traducción, y elementos derivados de sistemas virales (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominado secuencia CITE). El casete de expresión puede incluir también otras características tales como un origen de replicación, y/o elementos de integración de cromosomas tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales, o repeticiones terminales invertidas (ITR) virales adenoasociadas (AAV).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden asociarse con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, si se desea la secreción del anticuerpo o los fragmentos de polipéptido de esta, el ADN que codifica una secuencia de señal se puede

colocar corriente arriba del ácido nucleico, un anticuerpo de la invención o fragmentos de polipéptido de este. De acuerdo con la hipótesis de señales, las proteínas segregadas por las células de mamífero tienen un péptido de señal o una secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez iniciada la exportación de la cadena proteica en crecimiento a lo largo del retículo endoplásmico rugoso. Las personas del oficio de nivel medio son conscientes de que los polipéptidos segregados por las células de vertebrado tienen por lo general un péptido de señal fusionado con el extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido traducido para producir una forma segregada o “madura” del polipéptido. En algunas formas de realización, se utiliza el péptido de señal nativo, por ejemplo, un péptido de señal de la cadena pesada o la cadena liviana de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que está asociado operativamente con aquel. Alternativamente, se puede usar un péptido de señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional de este. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse con la secuencia líder de activador de plasminógeno tisular (TPA) humano o β-glucuronidasa de ratón.

El ADN que codifica una secuencia de proteína corta que puede usarse para facilitar una purificación posterior (por ejemplo, una etiqueta de histidina) o ayudar en el marcado de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se puede incluir dentro o en los extremos del polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención o los fragmentos de polipéptido de este.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos de la invención. En algunas formas de realización, se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de la invención. Los polinucleótidos y vectores pueden incorporar cualquiera de las características, por separado o en combinación, descritas en la presente en relación con los polinucleótidos y vectores, respectivamente. En un aspecto, una célula huésped comprende (por ejemplo, se transformó o se transfectó con) un vector que comprende un polinucleótido que codifica (parte de) un anticuerpo de la invención. Como se usa en la presente, la expresión “célula huésped” se refiere a cualquier clase de sistema celular que se puede modificar mediante ingeniería genética para generar las proteínas de fusión de la invención o fragmentos de estas. En el estado de la técnica se conocen células huésped adecuadas para replicar y soportar la expresión de moléculas de unión al antígeno. Tales células pueden transfectarse o transducirse según sea adecuado con el vector de expresión particular y se pueden cultivar grandes cantidades de células que contienen

vector para la siembra de fermentadores a gran escala a fin de obtener cantidades suficientes de la molécula de unión al antígeno para aplicaciones clínicas. Las células huésped adecuadas incluyen microorganismos procariotas, tales como *E. coli*, o diversas células eucariotas, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto o similares. Por ejemplo, los polipéptidos pueden producirse en bacterias, particularmente, cuando no se necesita glucosilación. Luego de la expresión, el polipéptido se puede aislar de la pasta de célula bacteriana en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican polipéptidos, que incluyen cepas de hongos y levadura cuyas vías de glucosilación se "humanizaron", lo que dio como resultado la producción de un polipéptido con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) y Li *et al.*, Nat Biotech 24, 210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos (glucosilados) también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se identificaron numerosas cepas baculovirales que se pueden usar en conjunto con células de insectos, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden usarse cultivos celulares vegetales como huéspedes. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.° 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para la producción de anticuerpos en plantas transgénicas). También pueden usarse células de vertebrados como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecimiento en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (linfocitos 293 o 293T, como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, J Gen Virol. 36, 59 (1977)), células de riñón de hámster bebé (BHK), células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, por ejemplo, en Mather, Biol. Reprod. 23, 243-251 (1980)), células de riñón de mono (CV1), células de riñón de mono verde africano (VERO-76), células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA), células de riñón canino (MDCK), células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A), células de pulmón humano (W138), células de hígado humano (Hep G2), células de tumor de mama de ratón (MMT 060562), células TRI (como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad Sci 383, 44-68 (1982)), células MRC 5 y células FS4. Otras líneas de células huésped de

mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células CHO dhfr (Urlaub *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)); y líneas celulares de mieloma, tales como YO, NS0, P3X63 y Sp2/0. Para una revisión de líneas de células huésped de ciertos mamíferos adecuadas para la producción de proteínas, ver, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), págs. 255-268 (2003). Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células cultivadas de mamífero, células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células vegetales, por nombrar solo algunas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénica o tejido animal o vegetal cultivado. En una forma de realización, la célula huésped es una célula eucariota, preferentemente, una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de riñón embrionaria (HEK) humana o una célula linfoide (por ejemplo, Y0, NS0, célula Sp20). En el estado de la técnica se conocen tecnologías estándar para expresar genes foráneos en estos sistemas. Las células que expresan un polipéptido que comprende la cadena pesada o la cadena liviana de una inmunoglobulina se pueden modificar por ingeniería genética para que también expresen la otra de las cadenas de inmunoglobulina, de modo tal que el producto expresado sea una inmunoglobulina que tenga tanto una cadena pesada como una cadena liviana.

En un aspecto, se proporciona un método para producir una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención o fragmentos de polipéptidos de esta, en donde el método comprende cultivar una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención o fragmentos de polipéptidos de este, como se proporciona en la presente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo de la invención o los fragmentos de polipéptidos de este, y recuperar el anticuerpo de la invención o los fragmentos de polipéptido de este de la célula huésped (o medio de cultivo de la célula huésped).

En algunos aspectos las porciones capaces de unirse de manera específica a un antígeno de una célula diana (por ejemplo, fragmentos Fab) que forma parte de la molécula de unión al antígeno comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno. Las regiones variables pueden formar parte y derivar de anticuerpos naturales o artificiales y fragmentos de estos. Los métodos para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales son conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos artificiales pueden construirse usando síntesis de péptidos en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante

(por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense N.º 4.186.567) o pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el cribado de colecciones de combinaciones que comprende cadenas pesadas variables y cadenas livianas variables (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.969.108 de McCafferty).

Se puede usar cualquier especie animal de inmunoglobulina en la invención. Las inmunoglobulinas no limitativas útiles en la presente invención pueden ser de origen murino, primate o humano. Si la proteína de fusión se prevé para uso humano, se puede usar una forma quimérica de inmunoglobulina en donde las regiones constantes de la inmunoglobulina sean de un ser humano. Una forma humanizada o completamente humana de la inmunoglobulina también puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 5.565.332 de Winter). La humanización se puede lograr mediante diversos métodos que incluyen, entre otros, (a) injertar las CDR no humanas (por ejemplo, anticuerpo del donante) en una estructura humana (por ejemplo, anticuerpo receptor) y las regiones constantes con o sin retención de residuos estructurales críticos (por ejemplo, aquellas que son importantes para conservar una buena afinidad de unión al antígeno o funciones del anticuerpo), (b) injertar solo las regiones determinantes de la especificidad no humanas (SDR o a-CDR; los residuos críticos para la interacción anticuerpo-antígeno) en estructuras humanas y regiones constantes, o (c) trasplantar la totalidad de los dominios variables no humanos, pero “ocultándolos” con una sección similar a la humana mediante reemplazo de los residuos de superficie. Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se reseñan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008), y también se describen, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, Nature 332, 323-329 (1988); Queen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); las patentes estadounidenses N.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321, y 7.087.409; Jones *et al.*, Nature 321, 522-525 (1986); Morrison *et al.*, Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri *et al.*, Methods 36, 25-34 (2005) (que describe injertos de SDR (a-CDR)); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (que describe el “resurgimiento”); Dall’Acqua *et al.*, Methods 36, 43-60 (2005) (que describe la “transposición de FR”); y Osbourn *et al.*, Methods 36, 61-68 (2005) y Klimka *et al.*, Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (que describe el enfoque de “selección guiada” para la transposición de FR). Las inmunoglobulinas particulares de acuerdo con la invención son inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en el estado de la técnica. Los

anticuerpos humanos se describen, por lo general, en van Dijk y van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368-74 (2001) y Lonberg, Curr Opin Immunol 20, 450-459 (2008). Las regiones variables humanas pueden formar parte y derivar de anticuerpos monoclonales humanos elaborados mediante el método de hibridoma (ver, por ejemplo, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir anticuerpos humanos intactos o anticuerpos intactos con regiones variables humanas en respuesta a una exposición a antígenos (ver, por ejemplo, Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005). Los anticuerpos humanos y las regiones variables humanas también pueden generarse mediante el aislamiento de secuencias de región variable del clon de Fv seleccionadas a partir de colecciones de expresión en fago derivadas de seres humanos (ver, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* en Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); y McCafferty *et al.*, Nature 348, 552-554; Clackson *et al.*, Nature 352, 624-628 (1991)). Normalmente, los fagos exhiben fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o como fragmentos Fab.

En algunos aspectos, las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 están modificadas por ingeniería genética para tener una mejor afinidad de unión de acuerdo con, por ejemplo, los métodos divulgados en la publicación PCT WO 2012/020006 (ver ejemplos en relación con la maduración por afinidad) o la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2004/0132066. La capacidad de las moléculas de unión al antígeno de la invención de unirse a un determinante antigénico específico puede medirse mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otras técnicas habituales para la persona del oficio de nivel medio, por ejemplo, técnica de resonancia de plasmones superficiales (Liljeblad, *et al.,* Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). Pueden usarse ensayos de competencia para identificar una molécula de unión al antígeno que compita con un anticuerpo de referencia para unirse a un antígeno particular. En algunas formas de realización, dicha molécula de unión al antígeno competitiva se une al mismo epítopo (por ejemplo, un epítopo lineal o conformacional) que se une mediante la molécula de unión al antígeno de referencia. Los métodos de ejemplo detallados para mapear un epítopo al que se une una molécula de unión al antígeno se proporcionan en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols", en Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). En un ensayo de competencia de ejemplo, el antígeno inmovilizado se

incuba en una solución que comprende una primera molécula de unión al antígeno marcada que se une al antígeno y una segunda molécula de unión al antígeno no marcada que se evalúa para determinar su capacidad para competir con la primera molécula de unión al antígeno por la unión al antígeno. La segunda molécula de unión al antígeno puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como un control, el antígeno inmovilizado se incuba en una solución que comprende la primera molécula de unión al antígeno marcada, pero no la segunda molécula de unión al antígeno no marcada. Después de la incubación en condiciones que permiten la unión del primer anticuerpo al antígeno, se retira el exceso de anticuerpo sin unir, y se mide la cantidad de marcador asociado con el antígeno inmovilizado. Si la cantidad de marcador asociada con el antígeno inmovilizado se reduce sustancialmente en la muestra de prueba con respecto a la muestra de control, entonces significa que la segunda molécula de unión al antígeno compite con la primera molécula de unión al antígeno por la unión al antígeno. Ver Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención preparadas como se describe en la presente se pueden purificar mediante técnicas conocidas en el estado de la técnica, tales como cromatografía de líquidos de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y similares. Las condiciones reales usadas para purificar una proteína particular dependerán, en parte, de factores tales como carga pura, hidrofobicidad, hidrofilia, etc., y serán claras para las personas del oficio de nivel medio. Para la purificación mediante cromatografía de afinidad, se puede usar un anticuerpo, ligando, receptor o antígeno al que se une la molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, para la purificación mediante cromatografía de afinidad de moléculas de unión al antígeno de la invención, se puede usar una matriz con proteína A o proteína G. Se puede usar cromatografía de afinidad secuencial con proteína A o G y cromatografía de exclusión por tamaño para aislar una molécula de unión al antígeno esencialmente como se describe en los ejemplos. La pureza de la molécula de unión al antígeno CD28 o los fragmentos de esta se puede determinar mediante diversos métodos analíticos conocidos, que incluyen electroforesis en gel, cromatografía de líquidos de alta resolución, y similares. Por ejemplo, la molécula de unión al antígeno CD28 expresada como se describe en los ejemplos mostró estar intacta y ensamblada adecuadamente como se demostró mediante SDS-PAGE reductora y no reductora.

Ensayos

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente pueden identificarse, cribarse o caracterizarse para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en el estado de la técnica.

1. Ensayos de afinidad

La afinidad de la molécula de unión al antígeno proporcionada en la presente por la diana correspondiente se puede determinar de acuerdo con los métodos establecidos en los ejemplos mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), usando instrumentos estándar tal como un instrumento Proteon (Bio-rad), y receptores o proteínas diana tales como las que se pueden obtener mediante expresión recombinante. La afinidad de la molécula de unión al antígeno que contiene un trímero del ligando de familia TNF por el antígeno de la célula diana también se puede determinar mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), usando instrumentos estándar tales como un instrumento Proteon (Bio-rad), y receptores o proteínas diana tales como las que se pueden obtener mediante expresión recombinante. Una forma de realización ilustrativa y de ejemplo específica para medir la afinidad de unión se describe en el ejemplo 4. De acuerdo con un aspecto, K_D se mide mediante resonancia de plasmones superficiales usando una máquina Proteon ® (Bio-Rad) a 25 °C.

2. Ensayos de unión y otros ensayos

La unión de la molécula biespecífica de unión al antígeno proporcionada en la presente a las correspondientes células que expresan los receptores se puede evaluar usando líneas celulares que expresan el receptor particular o el antígeno diana, por ejemplo, mediante citometría de flujo (FACS). En un aspecto, las células CHO que expresan CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano) se usan en el ensayo de unión.

En un aspecto adicional, las líneas celulares cancerosas que expresan el antígeno de la célula diana, por ejemplo, FAP o CEA, CD19 o CD79b, se usaron para demostrar la unión de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno al antígeno de la célula diana.

3. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar moléculas de unión al antígeno CD28 que tienen actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, proliferación de linfocitos T y secreción de citocina según lo medido con el método que se

describe en el ejemplo 6 o inactivación de células tumorales según lo medido en el ejemplo 7. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* e/o *in vitro*.

Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos indicados a continuación. En una forma de realización, una composición farmacéutica comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que se proporciona en la presente y al menos un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En otro aspecto, una composición farmacéutica comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 proporcionada en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas biespecíficas de unión al antígeno disueltas o dispersas en un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico. La expresión “aceptable desde el punto de vista farmacéutico o farmacológico” se refiere a composiciones y entidades moleculares que son en general no tóxicas para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, es decir, no producen una reacción adversa, alérgica o inadecuada en algún otro sentido cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según corresponda. Las personas del oficio de nivel medio conocerán la preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 y, opcionalmente, un ingrediente activo adicional a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.ª ed. Mack Printing Company, 1990, que se incorpora en la presente por referencia. En particular, las composiciones son formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Como se usa en la presente, "excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos y cada uno de los solventes, amortiguadores, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, estabilizantes, y combinaciones de estos, conocidos por una persona del oficio de nivel medio.

Las composiciones parenterales incluyen las diseñadas para la administración mediante

inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica, intralesional, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intratecal o intraperitoneal. Para la inyección, las moléculas de unión al antígeno que contienen un trímero del ligando de familia TNF de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente, en amortiguadores compatibles desde el punto de vista fisiológico, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o amortiguador de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. De manera alternativa, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de las proteínas de fusión de la invención en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los demás ingredientes enumerados a continuación, según sea necesario. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de suspensiones, emulsiones o soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío o liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de este de un medio líquido filtrado anteriormente de manera estéril. El medio líquido debe amortiguarse de manera adecuada, de ser necesario, y el diluyente líquido primero debe tornarse isotónico previo a la inyección con suficiente solución salina o glucosa. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preservarse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Cabe destacar que la contaminación con endotoxinas debe mantenerse mínimamente en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Los excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico adecuados incluyen, entre otros: amortiguadores, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol de fenol, butilo o bencilo; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina,

arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener compuestos que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas adecuadas. Los solventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (18.ª edición, Mack Printing Company, 1990). Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, en donde dichas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. En formas de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de estos. Los excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico de ejemplo de la presente también incluyen agentes de dispersión de fármacos intersticiales, tales como glucoproteínas hialuronidasas solubles activas a pH neutro (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas hialuronidasas solubles PH-20 humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Algunas sHASEGP de ejemplo y los métodos para su uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las publicaciones de patentes estadounidenses N.os 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglicanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Las formulaciones de anticuerpo liofilizadas de ejemplo se describen en la patente estadounidense N.° 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente estadounidense N.º 6.171.586 y WO2006/044908, y las formulaciones de esta última incluyen un amortiguador de histidina-acetato. Además de las composiciones descritas anteriormente, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 también puede formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden fabricar por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, emulsión, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de forma convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares aceptables desde el punto de vista fisiológico, que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que pueden usarse a nivel farmacéutico. La formulación adecuada depende de la vía de administración seleccionada. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención se puede formular en una composición en forma de ácido o base libre, neutro o de sal. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico son sales que retienen sustancialmente la actividad biológica del ácido o la base libre. Estas incluyen las sales de adición ácida, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o las que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilos libre también se pueden derivar de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos; o bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, o procaina. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos que las formas de base libre correspondientes. La composición en la presente también puede contener más de un ingrediente activo, según sea necesario, para la afección particular que se trata, preferentemente, aquellos que tienen actividades complementarias que no se perjudican de manera adversa entre sí. Dichos ingredientes

activos se encuentran en una combinación adecuada en una cantidad eficaz para el fin previsto. Por lo general, las formulaciones que se usan en la administración *in vivo* son estériles. La esterilidad puede lograrse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Métodos y composiciones terapéuticos

Cualquiera de las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 proporcionadas en la presente pueden usarse en métodos terapéuticos, solas o en combinación.

En un aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en el tratamiento del cáncer. En algunos aspectos, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de tratamiento. En algunos aspectos, en la presente se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. En una de estas formas de realización, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En un aspecto, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B. En aspectos particulares, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para uso en el tratamiento del trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (HL). En un aspecto particular, el cáncer de linfocitos B es linfoma no hodgkiniano o leucemia linfoblástica aguda. En algunos aspectos, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de tratamiento. En algunos aspectos, en la presente se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. En otro

aspecto, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene trastorno proliferativo de linfocitos B, en particular, un trastorno proliferativo de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de la zona marginal (MZL), mieloma múltiple (MM) y linfoma de Hodgkin (HL), que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. En una de estas formas de realización, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional.

En otros aspectos, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer. En algunas formas de realización, se proporciona una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 para su uso en un método de inmunotratamiento contra el cáncer. De acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, un “individuo” es, preferentemente, un ser humano.

En un aspecto adicional, en la presente se proporciona el uso de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente en la fabricación o preparación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento del cáncer. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un individuo con cáncer una cantidad eficaz del medicamento. En uno de estos aspectos, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otro aspecto, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno proliferativo de linfocitos B. En otro aspecto, el medicamento es para su uso en un método para tratar el cáncer o un trastorno proliferativo de linfocitos B que comprende administrar a un individuo con cáncer una cantidad eficaz del medicamento.

En un aspecto adicional, en la presente se proporciona un método para tratar un cáncer. En un aspecto, el método comprende administrar a un individuo que tiene cáncer una cantidad eficaz de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28. En uno de estos aspectos, el método también comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe a continuación. De acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores, un “individuo” puede ser un ser

humano.

En un aspecto adicional, en la presente se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que se informan en la presente, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los métodos terapéuticos anteriores. En un aspecto, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que se informan en la presente y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En otro aspecto, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 como se informa en la presente y al menos un agente terapéutico adicional.

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 como se informa en la presente pueden usarse solas o en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se informa en la presente puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional.

Los tratamientos conjuntos mencionados anteriormente incluyen la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o distintas formulaciones), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo como se informa en la presente puede llevarse a cabo antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En un aspecto, la administración de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 y la administración de un agente terapéutico adicional se producen con una diferencia de alrededor de un mes, o dentro de alrededor de una, dos o tres semanas, o dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Una molécula de unión al antígeno como se informa en la presente (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea, para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La administración puede llevarse a cabo mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, lo que depende, en parte, de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varios cronogramas de administración de dosis, que incluyen, entre otros, administraciones simples o múltiples durante diversos puntos temporales, administración por bolo e

infusión de pulso.

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 como se describen en la presente se pueden formular, dosificar y administrar de acuerdo con las buenas prácticas médicas. Algunos factores que se consideran en este contexto son el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se formula opcionalmente con uno o más agentes que se utilizan actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque esto no sea necesario. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores mencionados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosis y mediante las vías de administración descritas en la presente, o alrededor de 1 a 99 % de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía considerada adecuada de manera empírica/clínica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente (cuando se usa solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales distintos) dependerá del tipo de enfermedad que se desea tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se administra de forma adecuada al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede variar de alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados anteriormente. Por lo general, en el caso de administraciones repetidas durante el transcurso de varios días o más, según cuál sea la afección, el tratamiento se mantendrá hasta que se logre la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosis del anticuerpo está en el rango de alrededor de 0,05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/g, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación

de estas). Estas dosis se pueden administrar de manera intermitente, por ejemplo, una vez a la semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, o, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial mayor seguida por una o más dosis menores. Sin embargo, otros regímenes de dosis pueden ser útiles. Es posible monitorear fácilmente el progreso de este tratamiento mediante ensayos y técnicas convencionales.

Otros agentes y tratamientos

Las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden administrar en combinación con uno o varios agentes en el tratamiento. Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. La expresión “agente terapéutico” abarca cualquier agente que se pueda administrar para tratar un síntoma o enfermedad en un individuo que necesite tal tratamiento. Tal agente terapéutico adicional puede comprender cualquier ingrediente activo adecuado para la afección particular que se esté tratando, preferentemente, aquellas que tienen actividades complementarias que no se perjudican entre sí. En algunas formas de realización, un agente terapéutico adicional es otro agente antineoplásico, por ejemplo, un disruptor de microtúbulos, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa, un intercalador de ADN, un agente alquilante, un tratamiento hormonal, un inhibidor de quinasa, un antagonista del receptor, un activador de la apoptosis de células tumorales o un agente antiangiogénico. En algunos aspectos, un agente terapéutico adicional es un agente inmunomodulador, un agente citostático, un inhibidor de la adhesión celular, un agente citotóxico o citostático, un activador de la apoptosis celular o un agente que aumenta la sensibilidad de las células a los inductores apoptósicos.

Por lo tanto, se proporcionan moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención o composiciones farmacéuticas que las comprenden para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica de unión al antígeno se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, radiación y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer.

Estos otros agentes se encuentran en una combinación adecuada en una cantidad eficaz para el fin previsto. La cantidad eficaz de esos otros agentes depende de la cantidad de proteína de fusión que se use, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores

mencionados anteriormente. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno o el anticuerpo de la invención se usan por lo general en las mismas dosis y con las vías de administración descritas en la presente, o de alrededor de 1 a 99 % de las dosis descritas en la presente, o en cualquier dosis y mediante cualquier vía que se determine adecuada de manera empírica/clínica. Los tratamientos conjuntos mencionados anteriormente comprenden la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o en distintas composiciones) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la molécula biespecífica de unión al antígeno o el anticuerpo de la invención puede ocurrir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

En un aspecto adicional, se proporciona la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describió anteriormente en la presente para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica de unión al antígeno se administra en combinación con otro inmunomodulador. El término “inmunomodulador” se refiere a cualquier sustancia, que incluye un anticuerpo monoclonal, que afecta el sistema inmunitario. Las moléculas de la invención se pueden considerar inmunomoduladores. Los inmunomoduladores se pueden usar como agentes antineoplásicos para el tratamiento del cáncer. En un aspecto, los inmunomoduladores incluyen, entre otros, anticuerpos anti-CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab), anticuerpos anti-PD1 (por ejemplo, nivolumab o pembrolizumab), anticuerpos PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab, avelumab o durvalumab), anticuerpos OX-40, anticuerpos 4-1BB y anticuerpos GITR. Los tratamientos conjuntos mencionados anteriormente comprenden la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o en distintas composiciones) y la administración separada, en cuyo caso, la administración de la molécula biespecífica de unión al antígeno puede ocurrir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico adicional y/o adyuvante.

Combinación con anticuerpos biespecíficos para linfocitos T

En un aspecto, las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden administrar en combinación con anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de activación de linfocitos T. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 o un anticuerpo biespecífico anti-MCSP/anti-CD3. En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-

CEA/anti-CD3.

En un aspecto, una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor (TAA) seleccionado del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP), antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor alfa de folato (FolR1), proteoglucano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y p95HER2 es adecuada para la administración en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3. En otro aspecto particular, el TAA se selecciona del grupo que consiste en la proteína de activación de fibroblastos (FAP), el antígeno carcinoembrionario (CEA), EpCAM, HER3, CD30 o TPBG (5T4).

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 para su uso en la combinación comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende una secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO:439, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:440, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:441; y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:442, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:443, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:444. Más en particular, el biespecífico anti-CD3 comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:445 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:446. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:445 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:446.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 para su uso en la combinación comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende una secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO:596, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:597, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:598; y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:599, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:600, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:601. Más en particular, el biespecífico anti-CD3

comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:602 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:603. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:602 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:603.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 para su uso en la combinación comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende una secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO:604, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:605, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:606; y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:607, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:608, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:609. Más en particular, el biespecífico anti-CD3 comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:610 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:611. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:610 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:611.

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 comprende un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 161, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 162, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 163, y un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 164. En otra forma de realización particular, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 161, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 162, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 163 y una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 164 (CEA CD3 TCB).

En otro aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 comprende un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO:165, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO:166, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO:167, y un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO:168. En otra forma de realización particular, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO:165, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO:166, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO:167 y una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO:168 (CEACAM5 CD3 TCB).

Los anticuerpos biespecíficos particulares también se describen en la publicación PCT N.º WO 2014/131712 A1. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 también puede comprender un acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE®). En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 es un anticuerpo biespecífico como se describe en WO 2007/071426 o WO 2014/131712.

En otro aspecto, una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención que comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B se puede administrar en combinación con anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de activación de linfocitos T. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T es específico para un antígeno de superficie de linfocitos B, en particular, es un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3.

Los anticuerpos biespecíficos anti-CD20/anti-CD3 como se usan en la presente son anticuerpos biespecíficos que comprenden un primer dominio de unión al antígeno que se une a CD3, y un segundo dominio de unión al antígeno que se une a CD20. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 como se usa en la presente comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) y una región variable de la cadena liviana (V_LCD3), y un segundo dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) y una región variable de la cadena liviana (V_LCD20).

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 para su uso en la combinación comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende una secuencia CDR-H1 de

SEQ ID NO:439, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:440, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:441; y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:442, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:443, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:444. Más en particular, el biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un primer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:445 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:446. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:445 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:446.

En un aspecto, el anticuerpo que se une de manera específica a CD3 es un anticuerpo de longitud completa. En un aspecto, el anticuerpo que se une de manera específica a CD3 es un anticuerpo de la clase IgG humana, en particular, un anticuerpo de la clase IgG_1 humana. En un aspecto, el anticuerpo que se une de manera específica a CD3 es un fragmento de anticuerpo, particularmente, una molécula Fab o una molécula scFv, más en particular, una molécula Fab. En un aspecto particular, el anticuerpo que se une de manera específica a CD3 es una molécula Fab de entrecruzamiento, en donde los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y liviana de Fab se intercambian (es decir, se reemplazan entre sí). En un aspecto, el anticuerpo que se une de manera específica a CD3 es un anticuerpo humanizado.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende una secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO:447, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:448, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:449, y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:450, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:451, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:452. Más en particular, el biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:453 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:454. En un aspecto adicional, el biespecífico

anti-CD20/anti-CD3 comprende un segundo dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:453 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:454.

En otro aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión al antígeno que se une a CD20. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende una secuencia CDR-H1 de SEQ ID NO:447, una secuencia CDR-H2 de SEQ ID NO:448, y una secuencia CDR-H3 de SEQ ID NO:449; y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que comprende una secuencia CDR-L1 de SEQ ID NO:450, una secuencia CDR-L2 de SEQ ID NO:451, y una secuencia CDR-L3 de SEQ ID NO:452. Más en particular, el biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:453 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que es al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:454. En un aspecto adicional, el biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un tercer dominio de unión al antígeno que comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:453 y/o una región variable de la cadena liviana (V_LCD20) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:454.

En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es un anticuerpo biespecífico, en donde el primer dominio de unión al antígeno es una molécula crossFab, en donde los dominios variables o los dominios constantes de la cadena pesada y liviana de Fab se intercambian y, de estar presentes, el segundo y el tercer dominio de unión al antígeno son una molécula Fab convencional.

En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 es un anticuerpo biespecífico, en donde (i) el segundo dominio de unión al antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del primer dominio de unión al antígeno, el primer dominio de unión al antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión al antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del

dominio Fc, o (ii) el primer dominio de unión al antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo dominio de unión al antígeno, el segundo dominio de unión al antígeno se fusiona con el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y el tercer dominio de unión al antígeno se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

Las moléculas Fab pueden estar fusionadas al dominio Fc o entre sí directamente o a través de un ligador peptídico, que comprende uno o más aminoácidos, en general, alrededor de 2-20 aminoácidos. Los ligadores peptídicos son conocidos en el estado de la técnica y se describen en la presente. En un aspecto, dicho ligador peptídico es $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO:147). Otro ligador adecuado como tal comprende la secuencia $(G_4S)_4$ (SEQ ID NO:152). De manera adicional, los ligadores pueden comprender (una porción de) una región bisagra de inmunoglobulina. Particularmente, en donde una molécula Fab se fusiona con el extremo N de una subunidad de dominio Fc, puede estar fusionado mediante una región bisagra de inmunoglobulina o una porción de esta, con o sin un ligador peptídico adicional. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la unión a un receptor Fc y/o función efectora. En particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un dominio Fc de IgG1 que comprende las sustituciones de aminoácidos L234A, L235A y P329G.

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 comprende un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 455, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 456, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 457, y un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 458. En otra forma de realización particular, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 455, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 456, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 457 y una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 458 (CD20 TCB).

Los anticuerpos biespecíficos particulares se describen en la publicación PCT N.º WO 2016/020309 A1 o en WO 2015/095392 A1. En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 también puede comprender un acoplador de linfocitos T biespecífico (BiTE®). En un aspecto adicional, el anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-

CD3 es XmAb®13676. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico es REGN1979. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico es FBTA05 (*Lymphomun*).

En otro aspecto de la invención, la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención es para su uso en un método para tratar o retardar la progresión del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se usa en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 y, adicionalmente, se combinan con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1. Un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-1. En particular, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

En otro aspecto, una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención que comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de MM se puede administrar en combinación con anticuerpos biespecíficos anti-CD3 de activación de linfocitos T. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T es específico para un antígeno de superficie de MM, en particular, es un anticuerpo biespecífico anti-GPRC5D/anti-CD3.

En un aspecto particular, el anticuerpo biespecífico anti-GPRC5D/anti-CD3 comprende un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 398, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 399, un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 404, y un polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a la secuencia de SEQ ID NO: 405. En otro aspecto particular, el anticuerpo biespecífico comprende una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 398, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 399, una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 404 y una secuencia de polipéptidos de SEQ ID NO: 405 (GPRC5D CD3 TCB).

En otro aspecto, se proporciona un producto de combinación que comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente y un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T. En un aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 o un anticuerpo biespecífico anti-MCSP/anti-CD3. En un aspecto particular, el anticuerpo

biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3. En otro aspecto, el anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T específico para un antígeno asociado al tumor es un anticuerpo biespecífico anti-GPRC5D/anti-CD3.

Combinación con agentes que bloquean la interacción PD-L1/PD-1

En un aspecto, las moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 de la invención se pueden administrar en combinación con agentes que bloquean la interacción PD-L1/PD-1, tales como un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-1, en particular, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

En un aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. El término "**PD-L1**", también conocido como CD274 o B7-H1, se refiere a cualquier PD-L1 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos), primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), en particular a "PD-L1 humano". La secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano completo se muestra en UniProt (www.uniprot.org) con el número de acceso Q9NZQ7 (SEQ ID NO:459). La expresión **"antagonista de unión a PD-L1"** se refiere a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus componentes de unión, tal como PD-1, B7-1. En algunos aspectos, un antagonista de unión a PD-L1 es una molécula que inhibe la unión de PD-L1 a sus componentes de unión. En un aspecto específico, el antagonista de unión a PD-L1 inhibe la unión de PD-L1 a PD-1 y/o B7-1. En algunos aspectos, los antagonistas de unión a PD-L1 incluyen anticuerpos anti-PD-L1, fragmentos de unión al antígeno de estos, inmunoadhesinas, proteínas de fusión, oligopéptidos y otras moléculas que disminuyen, bloquean, inhiben, suprimen o interfieren en la transducción de señal resultante de la interacción de PD-L1 con uno o más de sus componentes de unión, tales como PD-1, B7-1. En un aspecto, un antagonista de unión a PD-L1 reduce la señal coestimuladora negativa mediada por, o a través de, proteínas de la superficie celular expresadas en la señalización mediada por linfocitos T a través de PD-L1 a fin de lograr que un linfocito T disfuncional sea menos disfuncional (por ejemplo, mejorar las respuestas efectoras al reconocimiento de antígenos). En particular, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. La expresión "**anticuerpo anti-PD-L1**" o

“anticuerpo que se une a PD-L1 humano” o “anticuerpo que se une de manera específica a PD-L1 humano” o “anti-PD-L1 antagonista” se refiere a un anticuerpo que se une de manera específica al antígeno de PD-L1 humano con una afinidad de unión de valor de KD de 1,0 x 10^{-8} mol/l o menor, en un aspecto de un valor de K_D de 1,0 x10^{-9} mol/l o menor. La afinidad de unión se determina mediante un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). En un aspecto particular, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en atezolizumab (MPDL3280A, RG7446), durvalumab (MEDI4736), avelumab (MSB0010718C) y MDX-1105. En un aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es YW243.55.S70 que se describe en la presente. En otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105, que se describe en la presente. Aun en otro aspecto específico, un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (durvalumab). Aun en otro aspecto, un anticuerpo anti-PD-L1 es MSB0010718C (avelumab). Más en particular, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es atezolizumab (MPDL3280A). En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PDL-1) de SEQ ID NO:460 y un dominio variable de la cadena liviana VL(PDL-1) de SEQ ID NO:461. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PDL-1) de SEQ ID NO:462 y un dominio variable de la cadena liviana VL(PDL-1) de SEQ ID NO:463.

El término “**PD-1**”, también conocido como CD279, PD1 o proteína de muerte celular programada 1, se refiere a PD-L1 nativo de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) primates no humanos (por ejemplo, *Macaca fascicularis*) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), en particular, a la proteína humana PD-1 con la secuencia de aminoácidos como se muestra en UniProt (www.uniprot.org) número de acceso Q15116 (SEQ ID NO:464). La expresión “**antagonista de unión a PD-1**” se refiere a una molécula que inhibe la unión de PD-1 a sus componentes de unión al ligando. En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1. En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L2. En algunas formas de realización, el antagonista de unión a PD-1 inhibe la unión de PD-1 a PD-L1 y PD-L2. En particular, un antagonista de unión a PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. La expresión “**anticuerpo anti-PD-1**” o “anticuerpo que se une a PD-1 humana” o “anticuerpo que se

une de manera específica a PD-1 humana" o "antagonista anti-PD-1" se refiere a un anticuerpo que se une de manera específica al antígeno de PD1 humana con una afinidad de unión de valor de KD de 1,0 x 10^{-8} mol/l o menor, en un aspecto, de un valor de KD de 1,0 x10^{-9} mol/l o menor. La afinidad de unión se determina mediante un ensayo de unión estándar, tal como la técnica de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). En un aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810 y BGB-108, en particular, de pembrolizumab y nivolumab. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PD-1) de SEQ ID NO:465 y un dominio variable de la cadena liviana VL(PD-1) de SEQ ID NO:466. En otro aspecto, el agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 que comprende un dominio variable de la cadena pesada VH(PD-1) de SEQ ID NO:467 y un dominio variable de la cadena liviana VL(PD-1) de SEQ ID NO:468.

En otro aspecto, se proporciona un producto de combinación que comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 como se describe en la presente y un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1, tal como un antagonista de unión a PD-L1 o un antagonista de unión a PD-1, en particular, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-1.

Los tratamientos conjuntos mencionados anteriormente incluyen la administración combinada (en donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas o distintas formulaciones), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del agente terapéutico puede llevarse a cabo antes, simultáneamente y/o después de la administración de un agente o agentes terapéuticos adicionales. En una forma de realización, la administración del agente terapéutico y la administración de un agente terapéutico adicional se producen con una diferencia de alrededor de un mes, o dentro de alrededor de una, dos o tres semanas, o dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días, entre sí.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos

descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con este. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz, por sí misma o en combinación con otra composición, para tratar, prevenir y/o diagnosticar la 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 que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección determinada. Asimismo, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de la invención; y (b) un segundo recipiente que contiene una composición, en donde la composición comprende otro citotóxico u agente terapéutico. El artículo de fabricación en esta forma de realización de la invención también puede comprender un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación también puede comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Tabla B (Secuencias):

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
1	hu CD28	UniProt n.º P10747, versión 1
2	hu FAP	UniProt n.º Q12884, versión 168
3	hu CEA	UniProt número de acceso P06731
4	FAP (28H1) CDR-H1	SHAMS
5	FAP (28H1)	AIWASGEQYYADSVKG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	CDR-H2	
6	FAP (28H1) CDR-H3	GWLGNFDY
7	FAP (28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
8	FAP (28H1) CDR-L2	GASTRAT
9	FAP (28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
10	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQ APGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSS
11	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQK PGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
12	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
13	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
14	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
15	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
16	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
17	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
18	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
19	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
20	CD28(SA) CDR-H1	SYYIH
21	CD28(SA) CDR-H2	CIYPGNVNTNYNEKFKD
22	CD28(SA) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
23	CD28(SA) CDR-L1	HASQNIYVWLN
24	CD28(SA) CDR-L2	KASNLHT
25	CD28(SA) CDR-L3	QQGQTYPYT
26	CD28(SA) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
27	CD28(SA) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
28	CD28(mAb 9.3) CDR-H1	DYGVH
29	CD28(mAb 9.3) CDR-H2	VIWAGGGTNYNSALMS
30	CD28(mAb 9.3) CDR-H3	DKGYSYYYSMDY
31	CD28(mAb 9.3) CDR-L1	RASESVEYYVTSLMQ
32	CD28(mAb 9.3) CDR-L2	AASNVES
33	CD28(mAb 9.3) CDR-L3	QQSRKVPYT
34	CD28(mAb 9.3) VH	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
35	CD28(mAb 9.3) VL	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIK
36	CD28 CDR-H1 consenso	SYYIH
37	CD28 CDR-H2 consenso	SIYPX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$TNYNEKFKD, en donde X$_1$ es G o R X$_2$ es N o D X$_3$ es V o G X$_4$ es N o Q o A
38	CD28 CDR-H3 consenso	SHYGX$_5$DX$_6$NFDV, en donde X$_5$ es L o A X$_6$ es W o H o Y o F
39	CD28 CDR-L1 consenso	X$_7$ASQX$_8$IX$_9$X$_{10}$X$_{11}$LN, en donde X$_7$ es H o R X$_8$ es N o G X$_9$ es Y o S X$_{10}$ es V o N X$_{11}$ es W o H o F o Y
40	CD28 CDR-L2 consenso	X$_{12}$X$_{13}$SX$_{14}$LX$_{15}$X$_{16}$, en donde X$_{12}$ es K o Y X$_{13}$ es A o T X$_{14}$ es N o S X$_{15}$ es H o Y X$_{16}$ es T o S
41	CD28 CDR-L3 consenso	QQX$_{17}$QTYPYT, en donde X$_{17}$ es G o A

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
42	CD28 VH variante a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
43	CD28 VH variante b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGTTVTVSS
44	CD28 VH variante c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGADHNFDVWGQGTTVTVSS
45	CD28 VH variante d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPRDGQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDYNFDVWGQGTTVTVSS
46	CD28 VH variante e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
47	CD28 VH variante f	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVSS
48	CD28 VH variante g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPRNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGTTVTVSS
49	CD28 VH variante h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWIGSIYPRDVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGTTVTVSS
50	CD28 VH variante i	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYIHWVRQAPGKGLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS
51	CD28 VH variante j	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYIHWVRQAPGKGLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
52	CD28 VL variante k	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVHLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQAQTYPYTFGGGTKVEIK
53	CD28 VL variante l	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
54	CD28 VL variante m	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
55	CD28 VL variante n	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
56	CD28 VL variante o	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
57	CD28 VL variante p	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
58	CD28 VL variante q	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISNHLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
59	CD28 VL variante r	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
60	CD28 VL variante s	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK
61	CD28 VL variante t	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGQGTKLEIK
62	CD28(SA) cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
63	CD28(SA) hu IgG4 cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
64	CD28(SA) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
65	VL-CD28(SA)-CL“RK”	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
66	CD28(SA) hu IgG1 PGLALA Fc botón	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
67	FAP(4B9) VL-CH hu IgG1 PGLALA Fc ojal	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
68	FAP(4B9) VH-Ckappa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
69	CD28(SA) VHCH-VHCH Fc botón FAP(4B9) VH PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQ GLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAII GSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
70	CD28(SA) VHCH-VHCH Fc ojal FAP(4B9) VL PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSQVQL VQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQ GLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELS RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSL SPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGS RRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIM LPPTFGQGTKVEIK
71	CD28(SA) VHCH- Fc botón FAP(4B9) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
72	CD28(SA) VHCH- Fc ojal FAP(4B9) VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPR LLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
73	CD28(SA) VHCH “EE”- Fc PGLALA FAP(4B9) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
74	FAP(4B9) VLCH1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCD
75	CD28(SA) VLCH1-FAP(4B9) VHCH1 “EE”-Fc botón PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGAS TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
76	FAP(4B9) VHCH1 “EE”-Fc ojal PGLALA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP
77	CD28(SA) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
78	FAP(4B9) VLCL “RK”	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
79	Fc ojal PGLALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
80	Fc botón – FAP(4B9) VH	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQ GTLVTVSS
81	CD28(SA) VHCH1 “EE”-Fc PGLALA CEA VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGL EWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	CEAVLCH1	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQ KPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGI LLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		VNHKPSNTKVDKKVEPKSC
83	CD28(SA) VHCH1- Fc botón CEA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGL EWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
84	CD28(SA) VHCH1- Fc ojal CEA VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVLTQP ASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQKPGSPPQ YLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQS EDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL
85	CD28(SA) VHCH1 “EE”-Fc ojal PGLALA HYRF	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNR FTQKSLSLSP
86	Fc botón PGLALA	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
87	CEA VL-CH1 hu IgG1 PGLALA Fc ojal	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQ KPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGI LLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
88	CEAVH-CL	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVR QAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
89	CD28(mAb 9.3) cadena liviana	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
90	CD28(mAb 9.3) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
91	CD28(mAb 9.3) hu IgG cadena liviana “RK”	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
92	CD28(mAb 9.3) hu IgG1 PGLALA Fc botón “EE”	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
93	CD28(mAb 9.3) VHCH-VHCH Fc botón FAP(4B9) VH PGLALA	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVK LQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPG QGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVFLK MNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
94	CD28(mAb 9.3) VHCH-VHCH Fc ojal FAP(4B9) VL PGLALA	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVK LQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPG QGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVFLK MNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPR LLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
95	CD28(mAb 9.3) VHCH- Fc botón FAP(4B9) VH	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
96	CD28(mAb 9.3) VHCH- Fc ojal FAP(4B9) VL	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPR LLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
97	CD28(mAb 9.3) VHCH “EE”- Fc PGLALA FAP(4B9) VHCL	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
98	CD28(mAb 9.3) VLCL “RK”	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
99	FAP(4B9) VLCH1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC
100	CD28(mAb 9.3) VLCH1-FAP(4B9) VHCH1 “EE”-Fc botón PGLALA	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGS GASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
101	CD28(mAb 9.3) VHCL	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
102	CD28(mAb 9.3) VHCH1 “EE”-Fc PGLALA CEA VHCL	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGL EWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
103	CD28(mAb 9.3) VHCH1- Fc botón CEA VH	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGL EWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
104	CD28(mAb 9.3) VHCH1- Fc ojal CEA VL	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVLTQP ASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQKPGSPPQ YLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGILLISGLQS EDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL
105	CD28(mAb 9.3) VHCH1 “EE”-Fc ojal PGLALA HYRF	EVKLQQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVRQS PGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVF LKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGTSVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
106	CD28(mAb 9.3) VLCL “RK”	DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQ QKPGQPPKLLIFAASNVESGVPARFSGSGSGTNFSLNIHPV DEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
107	CD28(SA) VHCH1 “EE” Fc ojal PGLALA FAP(4B9) VH – CEA(Medi-565) VHCL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAAS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLR FYFDYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC
108	CD28(SA) VHCH1 “EE” Fc botón PGLALA FAP(4B9) VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPR LLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		CQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
109	CEA VLCH1	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQ KPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGI LLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVLSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC
110	CD28(SA) VHCH1 Fc ojal PGLALA FAP(4B9) VH – CEA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAAS VKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLR FYFDYWGQGTTVTVSS
111	CD28(SA) VHCH1 Fc botón PGLALA FAP(4B9) VL – CEA VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPR LLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQGIMLPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSQAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWY QQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASAN AGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL
112	VH (CD28 SA) CH1 (EE)- Fc	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	botón PGLALA	SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
113	VH (CD28 variante g) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPRNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
114	VH (CD28 variante f) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
115	VH (CD28 variante j) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYIHWVRQA PGKGLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
116	VH (CD28 variante e) CH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	(EE)- Fc botón PGLALA	MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
117	VH (CD28 variante b) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
118	VH (CD28 variante a) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
119	VH (CD28 variante i) CH1 (EE) - Fc botón PGLALA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYYIHWVRQA PGKGLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
120	VL (CD28 variante k)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVHLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQAQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
121	VL (CD28 variante l)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
122	VL (CD28 variante m)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
123	VL (CD28 variante r)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
124	VL (CD28 variante s)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGISVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
125	VL (CD28 variante t)-CL (RK)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
126	Fc ojal PGLALA, HYRF	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP
127	CEA CDR-H1	SYWMH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
128	CEA CDR-H2	FIRNKANGGTTEYAASVKG
129	CEA CDR-H3	DRGLRFYFDY
130	CEA CDR-L1	TLRRGINVGAYSIY
131	CEA CDR-L2	YKSDSDKQQGSGV
132	CEA CDR-L3	MIWHSGASAV
133	CEA VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVR QAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTV TVSS
134	CEA VL	QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQ KPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSRFSASKDASANAGI LLISGLQSEDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL
135	FAP ECD humano etiquetado con His	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEY LHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPD RQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPR PIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRE NKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDT DIPVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPA YVGPQEVPVPAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFF VSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGK WEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSK KCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPISTLH DGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWY KMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYL ASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKC GIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVM ARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDF QAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKK KKKKGHHHHHH
136	FAP de ratón	UniProt número de acceso P97321
137	FAP ECD de ratón etiquetado con His	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWISEQEY LHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDYGLSPDR QFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPI QYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGREN RIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSD IPIIAYSYYGDGQYPRTINIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPH HVGPMEVPVPEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGF FVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSG KWEAIYIFRVTQDSLFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		KKCVTCHLRKERCQYYTASFSYKAKYYALVCYGPGLPISTL HDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKLKDGGLTF WYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNWIT YLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQ LTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLF KCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNST VMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQ VDFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLS DGKKKKKKGHHHHHH
138	FAP ECD de *Macaca fascicularis* etiquetado con His	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEY LHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPD RQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPR PIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRE NKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDT DIPVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPA YVGPQEVPVPAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFF VSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGK WEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSK KCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPISTLH DGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWY KMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYL ASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKC GIAVAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVM ARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDF QAMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKK KKKKGHHHHHH
139	FolR1 humano	UniProt número de acceso P15328
140	FolR1 murino	UniProt número de acceso P35846
141	FolR1 de *Macaca fascicularis*	UniProt número de acceso G7PR14
142	MCSP humano	UniProt número de acceso Q6UVK1
143	EGFR humano	UniProt número de acceso P00533
144	HER2 humano	Uniprot número de acceso P04626
145	p95 HER2	MPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRAS PLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQE TELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGT VYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMA GVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRG RLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRR

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		RFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEK GERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSR MARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLV DAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSSTRSGG GDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAA KGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSP QPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSP GKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFS PAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVP V
146	Ligador peptídico (G4S)	GGGGS
147	Ligador peptídico (G4S)2	GGGGSGGGGS
148	Ligador peptídico (SG4)2	SGGGGSGGGG
149	Ligador peptídico G4(SG4)2	GGGGSGGGGSGGGG
150	ligador peptídico	GSPGSSSSGS
151	(G4S)3 ligador peptídico	GGGGSGGGGSGGGGS
152	(G4S)4 ligador peptídico	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
153	ligador peptídico	GSGSGSGS
154	ligador peptídico	GSGSGNGS
155	ligador peptídico	GGSGSGSG
156	ligador peptídico	GGSGSG
157	ligador peptídico	GGSG

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
158	ligador peptídico	GGSGNGSG
159	ligador peptídico	GGNGSGSG
160	ligador peptídico	GGNGSG
161	Cadena liviana “CEA $_{2F1}$” (CEA TCB)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
162	Cadena Liviana humanizada CD3 $_{CH2527}$ (Crossfab, VL-CH1) (CEA TCB)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSC
163	CEA $_{CH1A1A 98/99}$ — CD3 $_{CH2527}$ humanizado (Crossfab VH-Ck)—Fc(botón) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP GKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
164	CEA $_{CH1A1A 98/99}$ (VH-CH1)—Fc(ojal) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
165	CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
166	CEA humanizado VH-CH1(EE)-Fc (ojal, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
167	CEA humanizado VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQP EDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
168	CEA humanizado VL-CL(RK) (CEACAM5 TCB)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
169	Antígeno Hu N(A2-B2)A-avi-His basado en CEACAM5	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVD GNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQN DTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPFITSNNSNP VEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSND NRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGP DDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQ QHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSA LSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFK NQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEVFNPIS KNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVDGSGLNDIFEAQKIEWH EARAHHHHHH
170	CEA (A5B7)-CDR-H1	DYYMN
171	CEA (A5B7)-CDR-H2	FIGNKANGYTTEYSASVKG
172	CEA (A5B7)-CDR-H3	DRGLRFYFDY
173	CEA (A5B7)-CDR-L1	RASSSVTYIH
174	CEA (A5B7)-CDR-L2	ATSNLAS
175	CEA (A5B7)-CDR-L3	QHWSSKPPT
176	IgG1 Fc botón PGLALA	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSP
177	IgG1 Fc ojal PGLALA	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSP
178	CEA (A5B7) VH (de origen)	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMNWVRQ PPGKALEWLGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSI LYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTLTVS S
179	CEA (A5B7) VL	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPG SSPKSWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	(de origen)	AATYYCQHWSSKPPTFGGGTKLEIK
180	CEA (A5H1EL1D)-CDR-H1	GFTFTDYYMN
181	CEA (A5H1EL1D)-CDR-H2	FIGNKANAYTTEYSASVKG
182	CEA (A5H1EL1D)-CDR-H3	DRGLRFYFDY
183	CEA (A5H1EL1D)-CDR-L1	RASSSVTYIH
184	CEA (A5H1EL1D)-CDR-L2	ATSNLAS
185	CEA (A5H1EL1D)-CDR-L3	QHWSSKPPT
186	CEA (A5H1EL1D) VH (3-23A5-1E)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
187	CEA (A5H1EL1D) VL (A5-L1D)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
188	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-H1 consenso	$GFX_1FX_2DYX_3MN$, en donde X_1 es T o Y, X_2 es T o S, y X_3 es Y o A o E
189	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-H2 consenso	$X_4IX_5NKANAYTTEYSASVKG$, en donde X_4 es F o V, X_5 es G o S

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
190	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-H3 consenso	DRGX_6RFX_7FDY, en donde X_6 es L o I, X_7 es Y o G o Q o S
191	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-L1 consenso	X_8ASSSVTYIH, en donde X_8 es R o H
192	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-L2 consenso	ATSNLAS
193	CEA (A5H1EL1D madurado por afinidad) CDR-L3 consenso	QHWSS$X_9$$X_{10}$PT, en donde X_9 es K o V o Q o I, X_{10} es P o S
194	CEA (P006.038) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTVTVSS
195	CEA (P006.038) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
196	CEA (P005.097) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFSFDYWGQGTTVTVSS
197	CEA (P005.097) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSQPPTFGQGTKLEIK
198	CEA (P005.103) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFYFDYWGQGTTVTVSS
199	CEA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	(P005.103) VL	VYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
200	CEA (P002.139) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNWVRQ APGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SS
201	CEA (P002.139) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
202	CEA (P001.177) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SS
203	CEA (P001.177) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
204	CEA (P005.102) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTVTVS S
205	CEA (P005.102) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
206	CEA (P005.102 combo1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTVTVS S
207	CEA (P005.102 combo1) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
208	CEA (P005.102 combo2) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFSDYYMNWVRQ APGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTVTVS S
209	CEA (P005.102 combo2) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
210	CEA (P005.103 combo1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDYWGQGTTVTVS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		S
211	CEA (P005.103 combo1) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
212	CEA (P005.103 combo2) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDYWGQGTTVTVSS
213	CEA (P005.103 combo2) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
214	CEA (P006.038 combo1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNWVRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTVTVSS
215	CEA (P006.038 combo1) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
216	CEA (P006.038 combo2) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMNWVRQAPGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTVTVSS
217	CEA (P006.038 combo2) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
218	IGHV3-23-02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
219	IGHV3-15*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
220	3-23A5-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
221	3-23A5-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
222	3-23A5-3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
223	3-23A5-4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
224	3-23A5-1A (todas_retromutaciones)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
225	3-23A5-1C (A93T)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
226	3-23A5-1D (K73)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
227	3-15A5-1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
228	3-15A5-2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGYTTEYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
229	3-15A5-3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGFIGNKANGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
230	IGKV3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP
231	A5-L1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
232	A5-L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYIHWYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		AVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
233	A5-L3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
234	A5-L4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQWSSKPPTFGQGTKLEIK
235	A5-L1A (todas_retromutaciones)	QTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG SSPKSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDF AVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
236	A5-L1B (Q1T2)	QTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
237	A5-L1C (FR2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGS SPKSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
238	NABA-avi-His	Ver tabla 15
239	N(A2B2)A-avi-His	Ver tabla 15
240	NA(B2)A-avi-His	Ver tabla 15
241	A5H1EL1D_H1_rev_TN	Ver tabla 16
242	A5H1EL1D_H2_for_TN	Ver tabla 16
243	LMB3 extenso	Ver tabla 16
244	HCDR3-rev-constante	Ver tabla 16
245	A5H1EL1D_L1_rev_TN	Ver tabla 17
246	A5H1EL1D_L2_for_TN	Ver tabla 17
247	A5H1EL1D_L3_for_TN	Ver tabla 18

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
248	A5H1EL1D _H3_rev_TN	Ver tabla 18
249	LCDR3-rev-constante	Ver tabla 18
250	Amplificación de HCDR3	Ver tabla 18
251	CEA (P006.038)-CDR-H1	Ver tabla 22
252	CEA (P006.038)-CDR-H2	Ver tabla 22
253	CEA (P006.038)-CDR-H3	Ver tabla 22
254	CEA (P006.038)-CDR-L1	Ver tabla 23
255	CEA (P006.038)-CDR-L2	Ver tabla 23
256	CEA (P006.038)-CDR-L3	Ver tabla 23
257	CEA (P005.097)-CDR-H1	Ver tabla 22
258	CEA (P005.097)-CDR-H2	Ver tabla 22
259	CEA (P005.097)-CDR-H3	Ver tabla 22
260	CEA (P005.097)-CDR-L1	Ver tabla 23
261	CEA (P005.097)-	Ver tabla 23

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	CDR-L2	
262	CEA (P005.097)-CDR-L3	Ver tabla 23
263	CEA (P005.103)-CDR-H1	Ver tabla 22
264	CEA (P005.103)-CDR-H2	Ver tabla 22
265	CEA (P005.103)-CDR-H3	Ver tabla 22
266	CEA (P005.103)-CDR-L1	Ver tabla 23
267	CEA (P005.103)-CDR-L2	Ver tabla 23
268	CEA (P005.103)-CDR-L3	Ver tabla 23
269	CEA (P002.139)-CDR-H1	Ver tabla 22
270	CEA (P002.139)-CDR-H2	Ver tabla 22
271	CEA (P002.139)-CDR-H3	Ver tabla 22
272	CEA (P002.139)-CDR-L1	Ver tabla 23
273	CEA (P002.139)-CDR-L2	Ver tabla 23

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
274	CEA (P002.139)-CDR-L3	Ver tabla 23
275	CEA (P001.177)-CDR-H1	Ver tabla 22
276	CEA (P001.177)-CDR-H2	Ver tabla 22
277	CEA (P001.177)-CDR-H3	Ver tabla 22
278	CEA (P001.177)-CDR-L1	Ver tabla 23
279	CEA (P001.177)-CDR-L2	Ver tabla 23
280	CEA (P001.177)-CDR-L3	Ver tabla 23
281	CEA (P005.102)-CDR-H1	Ver tabla 22
282	CEA (P005.102)-CDR-H2	Ver tabla 22
283	CEA (P005.102)-CDR-H3	Ver tabla 22
284	CEA (P005.102)-CDR-L1	Ver tabla 23
285	CEA (P005.102)-CDR-L2	Ver tabla 23
286	CEA (P005.102)-	Ver tabla 23

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	CDR-L3	
287	CEA (P005.102-combo1)- CDR-H1	Ver tabla 22
288	CEA (P005.102-combo1)- CDR-H2	Ver tabla 22
289	CEA (P005.102-combo1)- CDR-H3	Ver tabla 22
290	CEA (P005.102-combo1)- CDR-L1	Ver tabla 23
291	CEA (P005.102-combo1)- CDR-L2	Ver tabla 23
292	CEA (P005.102-combo1)- CDR-L3	Ver tabla 23
293	CEA (P005.102-combo2)- CDR-H1	Ver tabla 22
294	CEA (P005.102-combo2)- CDR-H2	Ver tabla 22
295	CEA (P005.102-combo2)- CDR-H3	Ver tabla 22
296	CEA (P005.102-combo2)- CDR-	Ver tabla 23

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	L1	
297	CEA (P005.102-combo2)- CDR-L2	Ver tabla 23
298	CEA (P005.102-combo2)- CDR-L3	Ver tabla 23
299	CEA (P005.103-combo1)- CDR-H1	Ver tabla 22
300	CEA (P005.103-combo1)- CDR-H2	Ver tabla 22
301	CEA (P005.103-combo1)- CDR-H3	Ver tabla 22
302	CEA (P005.103-combo1)- CDR-L1	Ver tabla 23
303	CEA (P005.103-combo1)- CDR-L2	Ver tabla 23
304	CEA (P005.103-combo1)- CDR-L3	Ver tabla 23
305	CEA (P005.103-combo2)- CDR-H1	Ver tabla 22
306	CEA (P005.103-combo2)- CDR-	Ver tabla 22

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	H2	
307	CEA (P005.103-combo2)- CDR-H3	Ver tabla 22
308	CEA (P005.103-combo2)- CDR-L1	Ver tabla 23
309	CEA (P005.103-combo2)- CDR-L2	Ver tabla 23
310	CEA (P005.103-combo2)- CDR-L3	Ver tabla 23
311	CEA (P006.038-combo1)- CDR-H1	Ver tabla 22
312	CEA (P006.038-combo1)- CDR-H2	Ver tabla 22
313	CEA (P006.038-combo1)- CDR-H3	Ver tabla 22
314	CEA (P006.038-combo1)- CDR-L1	Ver tabla 23
315	CEA (P006.038-combo1)- CDR-L2	Ver tabla 23
316	CEA (P006.038-combo1)- CDR-	Ver tabla 23

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	L3	
317	CEA (P006.038-combo2)- CDR-H1	Ver tabla 22
318	CEA (P006.038-combo2)- CDR-H2	Ver tabla 22
319	CEA (P006.038-combo2)- CDR-H3	Ver tabla 22
320	CEA (P006.038-combo2)- CDR-L1	Ver tabla 23
321	CEA (P006.038-combo2)- CDR-L2	Ver tabla 23
322	CEA (P006.038-combo2)- CDR-L3	Ver tabla 23
323	VL CEA (A5H1EL1D) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
324	VH CEA (A5H1EL1D) - CL	Ver tabla 24
325	VL CEA (P006.038) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
326	VH CEA (P006.038) - CL	Ver tabla 24
327	VL CEA (P005.097) -	Ver tabla 24

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	CH1- Fc ojal PGLALA	
328	VH CEA (P005.097) - CL	Ver tabla 24
329	VL CEA (P005.103) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
330	VH CEA (P005.103) - CL	Ver tabla 24
331	VL CEA (P002.139) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
332	VH CEA (P002.139) - CL	Ver tabla 24
333	VL CEA (P001.177) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
334	VH CEA (P001.177) - CL	Ver tabla 24
335	VL CEA (P005.102) - CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
336	VH CEA (P005.102) - CL	Ver tabla 24
337	VL CEA (P005.102 combo1) -CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
338	VH CEA (P005.102 combo1) - CL	Ver tabla 24
339	VL CEA (P005.102 combo2) -CH1-	Ver tabla 24

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	Fc ojal PGLALA	
340	VH CEA (P005.102 combo2) - CL	Ver tabla 24
341	VL CEA (P005.103 combo1) -CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
342	VH CEA (P005.103 combo1) - CL	Ver tabla 24
343	VL CEA (P005.103 combo2) -CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
344	VH CEA (P005.103 combo2) - CL	Ver tabla 24
345	VL CEA (P006.038 combo1) -CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
346	VH CEA (P006.038 combo1) - CL	Ver tabla 24
347	VL CEA (P006.038 combo2) -CH1- Fc ojal PGLALA	Ver tabla 24
348	VH CEA (P006.038 combo2) - CL	Ver tabla 24
349	VH CD28 (SA_Variante 15) – CH1- Fc botón PGLALA	Ver tabla 24
350	VL CD28 (SA_Variante 15) – CL	Ver tabla 24

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
351	CEA(A5H1EL1D) VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
352	CEA(A5H1EL1D) VH-Ckappa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
353	CD28(SA) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
354	CD28(SA) hu IgG1 VL-Ck “RK”	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
355	CD28 (SA_Variante 8) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		YTQKSLSLSP
356	CD28 (SA_Variante 8) hu IgG1 VL-Ck “RK”	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
357	CD28 (SA_Variante 15) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
358	CD28 (SA_Variante 15) hu IgG1 VL-Ck “RK”	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
359	CD28 (SA_Variante 29) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
360	CEA(A5H1EL1D) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc ojal PGLALA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
361	CEA(A5H1EL1D) hu IgG1 VL-Ck “RK”	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
362	CD28(SA) VL-CH1 hu IgG1 Fc botón PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
363	CD28(SA) VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
364	CD28 (SA_Variante 8) VL-CH1 hu IgG1 Fc botón PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
365	CD28 (SA_Variante 8) VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
366	CD28 (SA_Variante	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	15) VL-CH1 hu IgG1 Fc botón PGLALA	DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
367	CD28 (SA_Variante 15) VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
368	CD28 (SA_Variante 29) VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
369	CEA(T84.66) VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
370	CEA(T84.66) VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
371	CEA(T84.66) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc ojal PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP
372	CEA(T84.66) hu IgG1 VL-Ck "RK"	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
373	CEA(A5H1EL1D) VH-CH1-VH-CH1 "EE" hu IgG1 Fc ojal PGLALA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPG KGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYL QMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
374	CD28(SA) VL-CH1 CEA(A5H1EL1D) VH-CH1 "EE" hu IgG1 Fc botón PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKAN AYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYY CTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
375	CEA(P002.139) VL-CH1 hu	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQ APRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	IgG1 Fc ojal PGLALA	VYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
376	CEA(P002.139) VH-Ckappa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNT LYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
377	CD28 (SA_Variante 8) hu IgG1 cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
378	CD28 (SA_Variante 8) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
379	CD28 (SA_Variante 11) hu IgG1 cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
380	CD28 (SA_Variante 11) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
381	CD28 (SA_Variante 15) hu IgG1 cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
382	CD28 (SA_Variante 15) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
383	CD28 (SA_Variante 27) hu IgG1 cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGIYVYLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
384	CD28 (SA_Variante 27) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
385	CD28 (SA_Variante 29) hu IgG1 cadena liviana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		SSPVTKSFNRGEC
386	CD28 (SA_Variante 29) hu IgG1 PGLALA cadena pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
387	Etiqueta Avi	GLNDIFEAQKIEWHE
388	CD28 VHCH1 “EE”-$(G4S)_2$-FAP (4B9)-VHCH1 “EE” – Fc botón PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP
389	CD28 VLCL “RK”-$(G4S)_2$-FAP (4B9)-VLCL “RK”	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPG ERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
390	EpCAM(MT201) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDV

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	ojal PGLALA	WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV EDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSP
391	EpCAM(MT201) VL-Ckappa “RK”	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD RKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
392	Her3 VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSGNQKNYLT WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQSDYSYPYTFGQGTKLEIKSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SP
393	HER3 VH-Ckappa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRSSYISWVRQ APGQGLEWMGWIYAGTGSPSYNQKLQGRVTMTTDTSTST AYMELRSLRSDDTAVYYCARHRDYYSNSLTYWGQGTLVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
394	CD30 VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWY QQKPGQPPKVLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIKSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
395	CD30 VH-	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKP GQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAFM

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	Ckappa	QLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
396	TPBG VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQIGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED FATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
397	TPBG VH-Ckappa	EVHLLESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFRSDAMHWVRQ APGKGLEWVSGVSGSGGSPYYADSVKGRFTISRDDSKTTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATGGSIAGSYYYYPMDVWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
398	GPRC5D (5E11) hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc ojal PGLALA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
399	GPRC5D (5E11)VL-Ckappa “RK”	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
400	CD38 VL-CH1 hu IgG1 Fc ojal PGLALA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
401	CD38 VH-Ckappa	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
402	BCMA hu IgG1 VH-CH1 “EE” Fc ojal PGLALA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQ APGKGLEWVSAITASGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
403	BCMA VL-Ckappa “RK”	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAYYLAWYQQK PGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYERWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
404	GPRC5D (5E11) VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA) (GPRC5D TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVVTQ EPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQA FRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
405	CD3 VH-CL (GPRC5D TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQG TLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
406	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
407	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
408	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
409	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
410	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS
411	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	LQLLEDPYT
412	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSS
413	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWY LQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK
414	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
415	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
416	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
417	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
418	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
419	CD19 (8B8-	LQLTHVPYT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	018) CDR-L3	
420	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
421	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
422	CD79b (huMA79b.v28) CDR-H1	SYWIE
423	CD79b (huMA79b.v28) CDR-H2	EILPGGGDTNYNEIFKG
424	CD79b (huMA79b.v28) CDR-H3	RVPIRLDY
425	CD79b (huMA79b.v28) CDR-L1	KASQSVDYEGDSFLN
426	CD79b (huMA79b.v28) CDR-L2	AASNLES
427	CD79b (huMA79b.v28) CDR-L3	QQSNEDPLT
428	CD79b (huMA79b.v28) VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS
429	CD79b (huMA79b.v28) VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIK
430	VL (CD19 2B11) -CH1 Fc ojal PGLALA	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
431	VH (CD19 2B11) CL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQ APGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTA YMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
432	VL (huMA79b.v28) -CH1 Fc ojal PGLALA	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWY QQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLS CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
433	VH (huMA79b.v28) CL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQ APGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
434	CD19 humano	UniProt número de acceso P15391
435	CD79b humano	UniProt número de acceso P40259
436	CD20 humano	UniProt número de acceso P11836
437	CD22 humano	UniProt número de acceso P20273
438	CD37 humano	Uniprot número de acceso P11049
439	CD3-HCDR1	TYAMN
440	CD3-HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
441	CD3-HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
442	CD3-LCDR1	GSSTGAVTTSNYAN
443	CD3-LCDR2	GTNKRAP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
444	CD3-LCDR3	ALWYSNLWV
445	CD3 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSS
446	CD3 VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
447	CD20-HCDR1	YSWIN
448	CD20-HCDR2	RIFPGDGDTDYNGKFK
449	CD20-HCDR3	NVFDGYWLVY
450	CD20-LCDR1	RSSKSLLHSNGITYLY
451	CD20-LCDR2	QMSNLVS
452	CD20-LCDR3	AQNLELPYT
453	CD20 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVS S
454	CD20 VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK
455	CD20 VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (botón, P329G LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPG QAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
456	CD20 VH-CH1(EE)-Fc (ojal, P329G LALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQ APGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSP
457	CD20 VL-CL(RK)	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYL QKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
458	CD3 VH-CL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
459	PD-L1 humano	Uniprot número de acceso Q9NZQ7
460	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQ APGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVS S
461	VL (PD-L1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK
462	VH (PD-L1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLV TVSS
463	VL (PD-L1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK
464	PD-1 humano	Uniprot Q15116
465	VH (PD-1)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTTA

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		YMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTV SS
466	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWY QQKPGQAPRLLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
467	VH (PD-1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQ APGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTL FLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLVTVSS
468	VL (PD-1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK
469	EpCAM humana	UniProt n.º P16422
470	EpCAM murina	UniProt n.° Q99JW5
471	HER3 humano	UniProt n.º P21860
472	CD30 humano	UniProt n.° P28908
473	TBPG humano	UniProt n.° Q13641
474	CD38 humano	UniProt n.° P28907
475	BCMA humano	UniProt n.° Q02223
476	GPRC5D humano	UniProt n.° Q9NZD1
477	Dominio CH1 de IgG	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKV
478	Dominio CH2 de IgG	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
479	Dominio CH3 de IgG	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
480	Conector CH1	EPKSC
481	Bisagra completa	DKTHTCPXCP en donde X es S o P

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
482	Bisagra media	HTCPXCP en donde X es S o P
483	Bisagra corta	CPXCP en donde X es S o P
484	IgG1, alotipo caucásico	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
485	IgG1, alotipo afroamericano	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
486	IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
487	IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNY NTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEA LHNRFTQKSLSLSPGK
488	IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
		KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK
489	CD28(variante 8) CDR-H1	SYYIH
490	CD28(variante 8) CDR-H2	SIYPGNVQTNYNEKFKD
491	CD28(variante 8) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
492	CD28(variante 8) CDR-L1	HASQNIYVYLN
493	CD28(variante 8) CDR-L2	KASNLHT
494	CD28(variante 8) CDR-L3	QQGQTYPYT
495	CD28(variante 15) CDR-H1	SYYIH
496	CD28(variante 15) CDR-H2	SIYPGNVQTNYNEKFKD
497	CD28(variante 15) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
498	CD28(variante 15) CDR-L1	HASQNIYVFLN
499	CD28(variante 15) CDR-L2	KASNLHT
500	CD28(variante 15) CDR-L3	QQGQTYPYT
501	CD28(variante 29) CDR-H1	SYYIH
502	CD28(variante 29) CDR-H2	SIYPGNVNTNYNEKFKD
503	CD28(variante 29) CDR-H3	SHYGLDWNFDV
504	CD28(variante	HASQNIYVWLN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	29) CDR-L1	
505	CD28(variante 29) CDR-L2	KASNLHT
506	CD28(variante 29) CDR-L3	QQGQTYPYT
507	CEA (T84.66-LCHA)- CDR-H1	DTYMH
508	CEA (T84.66-LCHA)- CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQG
509	CEA (T84.66-LCHA)- CDR-H3	FGYYVSDYAMAY
510	CEA (T84.66-LCHA)-CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH
511	CEA (T84.66-LCHA)-CDR-L2	RASNRAT
512	CEA (T84.66-LCHA)-CDR-L3	QQTNEDPYT
513	CEA (T84.66-LCHA) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS
514	CEA (T84.66-LCHA) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
515	EpCAM (MT201)- CDR-H1	SYGMH
516	EpCAM (MT201)- CDR-H2	VISYDGSNKYYADSVKG
517	EpCAM (MT201)- CDR-H3	DMGWGSGWRPYYYYGM

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
518	EpCAM (MT201)- CDR-L1	RTSQSISSYLN
519	EpCAM (MT201)- CDR-L2	WASTRES
520	EpCAM (MT201)- CDR-L3	QQSYDIPYT
521	EpCAM (MT201) VH	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
522	EpCAM (MT201) VL	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK
523	HER3-CDR-H1	SSYIS
524	HER3-CDR-H2	WIYAGTGSPSYNQKLQG
525	HER3-CDR-H3	HRDYYSNSL
526	HER3-CDR-L1	KSSQSVLNSGNQKNYLT
527	HER3-CDR-L2	WASTRES
528	HER3-CDR-L3	QSDYSYPYT
529	HER3 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFRSSYISWVRQAPGQGLEWMGWIYAGTGSPSYNQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARHRDYYSNSLTYWGQGTLVTVSS
530	HER3 VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQSDYSYPYTFGQGTKLEIK
531	CD30-CDR-H1	DYYIT
532	CD30-CDR-H2	WIYPGSGNTKYNEKFKG
533	CD30-CDR-H3	YGNYWF
534	CD30-CDR-L1	KASQSVDFDGDSYMN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
535	CD30-CDR-L2	AASNLES
536	CD30-CDR-L3	QQSNEDPWT
537	CD30 VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKP GQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAFM QLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSA
538	CD30 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWY QQKPGQPPKVLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK
539	TPBG(FAB091) - CDR-H1	SDAMH
540	TPBG(FAB091) - CDR-H2	GVSGSGGSPYYADSVKG
541	TPBG(FAB091) - CDR-H3	GGSIAGSYYYYPMDV
542	TPBG(FAB091) - CDR-L1	QASQDISNYLN
543	TPBG(FAB091) - CDR-L2	AASTLQI
544	TPBG(FAB091) - CDR-L3	QQANSFPLT
545	TPBG(FAB091) VH	EVHLLESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTFRSDAMHWVRQ APGKGLEWVSGVSGSGGSPYYADSVKGRFTISRDDSKTTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATGGSIAGSYYYYPMDVWGQGT TVTVSS
546	TPBG(FAB091) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQIGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED FATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
547	CD38- CDR-H1	SFAMS
548	CD38- CDR-H2	AISGSGGGTYYADSVKG
549	CD38- CDR-H3	DKILWFGEPVFDY
550	CD38- CDR-L1	RASQSVSSYLA
551	CD38- CDR-L2	DASNRAT
552	CD38- CDR-L3	QQRSNWPPT

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
553	CD38 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVT VSS
554	CD38 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
555	BCMA - CDR-H1	SYAMN
556	BCMA - CDR-H2	AITASGGSTYYADSVKG
557	BCMA - CDR-H3	YWPMSL
558	BCMA - CDR-L1	RASQSVSAYYLA
559	BCMA - CDR-L2	DASIRAT
560	BCMA - CDR-L3	QQYERWPLT
561	BCMA VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQ APGKGLEWVSAITASGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARYWPMSLWGQGTLVTVSS
562	BCMA VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSAYYLAWYQQK PGQAPRLLMYDASIRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYERWPLTFGQGTKVEIK
563	GPRC5D (5E11) - CDR-H1	KYAMA
564	GPRC5D (5E11) - CDR-H2	SISTGGVNTYYADSVKG
565	GPRC5D (5E11) - CDR-H3	HTGDYFDY
566	GPRC5D (5E11) - CDR-L1	RASQSVSISGINLMN

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
567	GPRC5D (5E11) - CDR-L2	HASILAS
568	GPRC5D (5E11) - CDR-L3	QQTRESPLT
569	GPRC5D (5E11) VH1c	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
570	GPRC5D (5E11) VL2b	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
571	GPRC5D (5E11) VH1a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
572	GPRC5D (5E11) VH1b	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYRDSVKARFTISRDNAKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
573	GPRC5D (5E11) VH1d	ELQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQ APGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
574	GPRC5D (5E11) VL1a	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
575	GPRC5D (5E11) VL1c	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
576	GPRC5D (5E11) VL2a	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPRLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
577	GPRC5D (5E11) VL3a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGKQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
578	GPRC5D (5E11) VL3b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSISGINLMNWYQ QKPGQQPKLLIYHASILASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
579	GPRC5D (5F11) - CDR-	NYGMA

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	H1	
580	GPRC5D (5F11) - CDR-H2	SISTGGGNTYYRDSVKG
581	GPRC5D (5F11) - CDR-H3	HDRGGLY
582	GPRC5D (5F11) - CDR-L1	RSSKSLLHSNGITYVY
583	GPRC5D (5F11) - CDR-L2	RMSNRAS
584	GPRC5D (5F11) - CDR-L3	GQLLENPYT
585	GPRC5D (5F11) VH1a	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
586	GPRC5D (5F11) VH1b	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
587	GPRC5D (5F11) VH1c	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
588	GPRC5D (5F11) VH1d	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
589	GPRC5D (5F11) VH2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYRDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
590	GPRC5D (5F11) VH2d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNYGMAWVR QAPGKGLEWVASISTGGGNTYYADSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHDRGGLYWGQGTMVTVSS
591	GPRC5D (5F11) VL1a	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYVYWYL QKPGQSPQVLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
592	GPRC5D (5F11) VL1b	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYVYWYL QKPGKSPQVLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK
593	GPRC5D (5F11) VL2a	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYVYWYL QKPGQSPQLLIYRMSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK
594	GPRC5D (5F11) VL2b	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSLLHSNGITYVYWY QQKPGQPPKLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK
595	GPRC5D (5F11) VL2c	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASKSLLHSNGITYVYWY QQKPGQAPRLLIYRMSNLASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYHCGQLLENPYTFGQGTKLEIK
596	CD3 (Cl22) CDR-H1	SYAMN
597	CD3 (Cl22) CDR-H2	RIRSKYNNYATYYADSVKG
598	CD3 (Cl22) CDR-H3	HTTFPSSYVSYYGY
599	CD3 (Cl22) CDR-L1	GSSTGAVTTSNYAN
600	CD3 (Cl22) CDR-L2	GTNKRAP
601	CD3 (Cl22) CDR-L3	ALWYSNLWV
602	CD3 (Cl22) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSSYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHTTFPSSYVSYYGYWGQG TLVTVSS
603	CD3 (Cl22) VL	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQ EKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG AQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
604	CD3 (V9) CDR-H1	GYSFTGYTMN
605	CD3 (V9) CDR-H2	LINPYKGVSTYNQKFKD
606	CD3 (V9) CDR-	SGYYGDSDWYFDV

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
	H3	
607	CD3 (V9) CDR-L1	RASQDIRNYLN
608	CD3 (V9) CDR-L2	YTSRLES
609	CD3 (V9) CDR-L3	QQGNTLPWT
610	CD3 (V9) VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS
611	CD3 (V9) VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK

Se proporciona información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas liviana y pesada de inmunoglobulinas humanas en: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpo se numeran y se indican de acuerdo con los sistemas de numeración de acuerdo con Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) como se definió anteriormente.

Los siguientes párrafos enumerados describen aspectos de la presente invención:

1. Una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 caracterizada por la unión monovalente a CD28, que comprende

(a) un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) al menos un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos

que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

2. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 del párrafo 1, en donde el dominio Fc es una IgG, en particular, un dominio Fc de IgG1 o un dominio Fc de IgG4.

3. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de los párrafos 1 o 2, en donde el dominio Fc es de subclase de IgG1 humana y comprende las mutaciones de los aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

4. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 3, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

5. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25.

6. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 5, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, y

una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

7. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:60.

8. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 4, o 7, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

9. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 8, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica al antígeno carcinoembrionario (CEA).

10. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 9, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:127, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:128, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:129, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:130, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:131, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:132.

11. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 10, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CEA comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:133, y una región variable de la cadena liviana (V_LCEA) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:134.

12. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 8, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

13. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 8 o 12, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

14. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 8 o 12 o 13, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

15. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 8 o 12 o 14, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a FAP comprende una región variable de la cadena pesada (V_HFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18 y una región variable de la cadena liviana (V_LFAP) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19.

16. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 15, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 es un fragmento Fab o un fragmento crossFab.

17. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 16, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

18. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 16, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

19. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 16, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del domino Fc, y el tercer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

20. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 16, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un dominio VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del dominio Fc, y en donde uno de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusionan mediante un ligador peptídico al extremo C de la primera subunidad del dominio Fc y el otro de los dominios VH y VL capaces de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona mediante un ligador peptídico al extremo C de la segunda subunidad del dominio Fc.

21. Un polinucleótido que codifica la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20.

22. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 21.

23. Un método para producir la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20 que comprende cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 22 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión al antígeno.

24. Una composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20 y al menos un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

25. La composición farmacéutica del párrafo 24 para su uso en el tratamiento del cáncer.

26. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20, o la composición farmacéutica del párrafo 24, para su uso como medicamento.

27. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los

párrafos 1 a 20, o la composición farmacéutica del párrafo 24, para su uso en el tratamiento del cáncer.

28. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer.

29. Uso de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20, o la composición farmacéutica del párrafo 24, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

30. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20, o la composición farmacéutica del párrafo 24, para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

31. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 1 a 20, o la composición farmacéutica del párrafo 24.

32. Una molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 que comprende un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28, un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

33. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 del párrafo 32, caracterizada por la unión monovalente a CD28.

34. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 del párrafo 32, también caracterizada por la unión monovalente al antígeno de superficie de linfocitos B.

35. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 34, en donde el dominio Fc es de subclase de IgG1 humana y comprende

las mutaciones de los aminoácidos L234A, L235A y P329G (numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat).

36. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 35, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una región determinante de la complementariedad de la cadena liviana CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25; o

(ii) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 36, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 37, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 38, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 39, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 40 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 41.

37. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 36, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una CDR-H1 de SEQ ID NO: 20, una CDR-H2 de SEQ ID NO: 21, y una CDR-H3 de SEQ ID NO: 22, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una CDR-L1 de SEQ ID NO: 23, una CDR-L2 de SEQ ID NO: 24 y una CDR-L3 de SEQ ID NO: 25.

38. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 37, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

39. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 36, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera

específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50 y SEQ ID NO:51, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60 y SEQ ID NO:61.

40. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 36, o 39, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(c) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:51 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:61, o

(d) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(e) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o

(f) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(g) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:48 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(h) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27, o

(i) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o

(j) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59, o

(k) una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27.

41. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 36, o 39, o 40, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD28 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:53, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:54, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:47 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, o una región variable de la cadena pesada (V_HCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD28) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9.

42. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 41, en donde el antígeno de superficie de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en CD19, CD79b, CD20, CD22 y CD37.

43. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 42, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera

específica a un antígeno de superficie de linfocitos B es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19.

44. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 43, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:406, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:407, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:408, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:409, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:410, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:411, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:414, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:415, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:416, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:417, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:418, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:419.

45. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 44, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende

(a) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413, o

(b) una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:420, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %,

o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:421.

46. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 45, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD19 comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:412 y una región variable de la cadena liviana (V_LCD19) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:413.

47. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 43, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B es un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b.

48. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 43, o 47, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende (i) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:422, (ii) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:423, y (iii) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:424, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende (iv) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:425, (v) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:426, y (vi) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:427.

49. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 43, o 47, o 48, en donde el dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a CD79b comprende una región variable de la cadena pesada (V_HCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:428, y una región variable de la cadena liviana (V_LCD79b) que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos alrededor de 95 %, 98 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:429.

50. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 49, que comprende

(a) un fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un fragmento crossFab capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora.

51. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 49, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de una de las subunidades del dominio Fc.

52. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 49, que comprende

(a) un primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28,

(b) un segundo y un tercer fragmento Fab capaces de unirse de manera específica a un antígeno de superficie de linfocitos B, y

(c) un dominio Fc compuesto por una primera y una segunda subunidad capaces de lograr una asociación estable que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión de la molécula de unión al antígeno por un receptor Fc y/o función efectora,

en donde el primer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a CD28 se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la cadena pesada de Fab del segundo fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor, que a su vez se fusiona en su extremo C con el extremo N de la primera subunidad del domino Fc, y el tercer fragmento Fab capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor se fusiona en el extremo C de la cadena pesada de Fab con el extremo N de la segunda subunidad del dominio Fc.

53. Una composición farmacéutica que comprende la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 y al menos un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

54. Un polinucleótido que codifica la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52.

55. Un vector que comprende el polinucleótido del párrafo 54.

56. Una célula huésped que comprende el vector del párrafo 55 o el polinucleótido del párrafo 54.

57. Un método para producir la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 que comprende cultivar la célula huésped del párrafo 25 en condiciones adecuadas para la expresión de la molécula biespecífica de unión al antígeno.

58. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52, o la composición farmacéutica del párrafo 53, para su uso como medicamento.

59. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52, o la composición farmacéutica del párrafo 53, para su uso en el tratamiento del cáncer.

60. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para administrar en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia y/u otros agentes para su uso en el inmunotratamiento contra el cáncer.

60. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para administrar en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CD3 de activación de linfocitos T.

61. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para administrar en combinación con un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3.

62. La molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 es para administrar en combinación con un agente que bloquea la interacción PD-L1/PD-1.

63. Uso de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52, o la composición farmacéutica del párrafo 53, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

64. Un método para inhibir el crecimiento de células tumorales en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52, o la composición farmacéutica del párrafo 53, para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

65. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula biespecífica agonista de unión al antígeno CD28 de cualquiera de los párrafos 32 a 52, o la composición farmacéutica del párrafo 53.

***

EJEMPLOS

A continuación, se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Cabe destacar que varias otras formas de realización se pueden poner en práctica de acuerdo con la descripción general proporcionada anteriormente.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron métodos estándar para manipular ADN como se describe en Sambrook *et al*.,

Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Los reactivos biológicos moleculares se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se proporciona información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina humana en: Kabat, E.A. *et al*., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª Ed., publicación NIH N.º 91-3242.

Secuenciación de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación bicatenaria.

Síntesis génica

Los segmentos génicos deseados, de ser necesario, se generaron mediante PCR usando plantillas adecuadas o se sintetizaron en Geneart AG (Regensburg, Alemania) o Genscript (Nueva Jersey, EE.UU.) a partir de oligonucleótidos sintéticos y productos de PCR mediante síntesis génica automatizada. Los segmentos génicos flanqueados por sitios de escisión de endonucleasa de restricción singular se clonaron en vectores de clonación/secuenciación estándar. El ADN de plásmido se purificó de bacterias transformadas, y la concentración se determinó mediante espectroscopia UV. La secuencia de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los segmentos génicos se diseñaron con sitios de restricción adecuados a fin de permitir la subclonación en los respectivos vectores de expresión. Todos los constructos se diseñaron con una secuencia de ADN de extremo 5' que codifica un péptido guía que actúa sobre proteínas para la secreción en células eucariotas.

Técnicas de cultivo celular

Se usaron técnicas de cultivo celular estándar descritas en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Purificación de proteínas

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. De manera resumida, los anticuerpos se aplicaron a una columna de proteína A sefarosa (GE healthcare) y se lavaron con PBS. La elución de anticuerpos se logró a pH 2,8 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína agregada se

separó de anticuerpos monoméricos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200, GE Healthcare) en PBS o en 20 mM de histidina, 150 mM de NaCl, pH 6,0. Las fracciones de anticuerpo monomérico se agruparon, se concentraron (de ser necesario) usando, por ejemplo, un concentrador centrífugo MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), se congelaron y se almacenaron a -20 °C o -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para el posterior análisis de proteínas y la caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

SDS-PAGE

El sistema de gel prefabricado NuPAGE® (Invitrogen) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En particular, se usó 10 % o 4-12 % de geles prefabricados Bis-TRIS Novex® NuPAGE® (pH 6,4) y un amortiguador de corrida MES NuPAGE® (geles reducidos, con aditivo de amortiguador de corrida antioxidante NuPAGE®) o MOPS (geles no reducidos).

Cromatografía de exclusión por tamaño analítica

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la determinación de la agregación y el estado oligomérico de los anticuerpos se llevó a cabo mediante cromatografía HPLC. Brevemente, los anticuerpos purificados con proteína A se aplicaron a una columna Tosoh TSKgel G3000SW en 300 mM de NaCl, 50 mM de KH_2PO_4/K_2HPO_4, pH 7,5 en un sistema Agilent HPLC 1100, o a una columna Superdex 200 (GE Healthcare) en 2 x PBS en un sistema HPLC Dionex. La proteína eluida se cuantificó mediante absorbancia de UV e integración de áreas de picos. El estándar de filtración en gel BioRad 151–1901 sirvió como estándar.

Espectrometría de masas

Esta sección describe la caracterización de los anticuerpos multiespecíficos con intercambio VH/VL (VH/VL CrossMabs) con énfasis en su correcto ensamblaje. Las estructuras primarias esperadas se analizaron mediante ionización por electrospray-espectrometría de masas (ESI-MS) de CrossMabs intactos desglucosilados y CrossMabs digeridos por plasmina/desglucosilados o digeridos por LysC limitada/desglucosilados de manera alternativa.

Los VH/VL CrossMabs se desglucosilaron con N-glucosidasa F en un amortiguador de fosfato o Tris a 37 °C por hasta 17 h a una concentración de proteínas de 1 mg/ml. Las

digestiones por plasmina o de LysC limitadas (Roche) se realizaron con 100 µg de VH/VL CrossMabs desglucosilados en un amortiguador Tris a pH 8 a temperatura ambiente durante 120 horas y a 37 °C durante 40 min, respectivamente. Antes de la espectrometría de masas, las muestras se desalaron mediante HPLC en una columna Sephadex G25 (GE Healthcare). La masa total se determinó mediante ESI-MS en un sistema MS QTOF UHR 4G maXis (Bruker Daltonik) equipado con una fuente NanoMate TriVersa (Advion).

Determinación de unión y afinidad de unión de anticuerpos multiespecíficos a los respectivos antígenos usando resonancia de plasmones superficiales (SPR) (BIACORE)

La unión de los anticuerpos generados a los respectivos antígenos se investiga mediante resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento BIACORE (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Suecia). Brevemente, para las mediciones de afinidad anticuerpos de cabra anti-IgG humana JIR 109-005-098 se inmovilizaron en un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas para la presentación de los anticuerpos contra el respectivo antígeno. La unión se midió en amortiguador de HBS (HBS-P (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 0,005 % de Tween 20, ph 7,4), 25 °C (o alternativamente a 37 °C). El antígeno (R&D Systems o purificado dentro del establecimiento) se agregó en diversas concentraciones en solución. La asociación se midió mediante una inyección de antígeno de 80 segundos a 3 minutos; la disociación se midió al lavar la superficie del chip con amortiguador de HBS durante 3-10 minutos, y un valor de KD se estimó usando un modelo de unión Langmuir 1:1. Los datos de control negativo (por ejemplo, curvas de amortiguador) se sustrajeron de curvas de muestra para la corrección de la deriva inicial intrínseca del sistema y para la reducción de señal de ruido. El respectivo *software* de evaluación Biacore se usó para el análisis de sensogramas y para el cálculo de datos de afinidad.

Ejemplo 1

Generación y producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

1.1 Clonación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

Clonación del antígeno:

Un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular (aminoácidos 1 a 134 de proteína madurada) de CD28 humano (Uniprot: P10747) se insertó en la estructura en dos diferentes vectores receptores mamíferos corriente arriba de un fragmento que codificaba un fragmento hum IgG1 Fc que servía como etiqueta de solubilidad y purificación. Uno de los vectores de expresión contenía las mutaciones de “ojal” en la región Fc, el otro contenía las mutaciones de “botón”, así como una etiqueta avi de extremo C (GLNDIFEAQKIEWHE, SEQ ID NO:387), lo que permitía la biotinilación específica durante la coexpresión con biotina ligasa BirA. Además, ambos fragmentos Fc contenían las mutaciones PG-LALA. Ambos vectores se cotransfectaron en combinación con un plásmido que codificaba la biotina ligasa BirA a fin de obtener un constructo CD28-Fc dimérico con una etiqueta avi biotinilada monovalente en el extremo C terminal de la cadena Fc-botón.

Los dominios variables del clon de FAP 4B9, un aglutinante de CEA y los clones de CD28 SA y mAb 9.3 se usaron para la generación de diversos constructos CD28 que actúan sobre el tumor. La generación y preparación del clon de FAP 4B9 se divulga en WO 2012/020006 A2, que se incorpora en la presente por referencia. El clon de CEA usado en las moléculas se describe en WO 2007/071422, y el anticuerpo superagonista (SA) contra CD28 con una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:27 se describe en WO 2006/050949. Una descripción del anticuerpo mAb 9.3 se puede hallar en Tan *et al*. J. Immunology 2002, 169, 1119-1125. Para la generación de los respectivos plásmidos de expresión, las secuencias de los respectivos dominios variables se usaron y se subclonaron en la estructura con las respectivas regiones constantes preinsertadas en el respectivo vector de expresión mamífero receptor. Una descripción esquemática de las moléculas resultantes se muestra en las **figuras 1A a 1M**. Cuando se indica, se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a receptores Fc gamma. Para la generación de anticuerpos biespecíficos asimétricos, los fragmentos Fc contenían las mutaciones “botón” u “ojal” para evitar el error de apareamiento de las cadenas pesadas. A fin de evitar el error de apareamiento de las cadenas livianas en constructos de anticuerpo biespecífico y multiespecífico, un intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa se introdujo en una porción de unión (tecnología CrossFab). En otra porción de unión, se introdujeron cargas en los dominios CH1 y Ckappa.

Las siguientes moléculas se clonaron, una ilustración esquemática de estas se muestra en las **figuras 1A a 1M**:

Molécula A: anticuerpo contra CD28(SA) (hu IgG4), TGN1412, CD28 (SA) en un isotipo IgG4 humana **(figura 1A),** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:62 y SEQ ID NO:63 (P1AE1975).

Molécula B: anticuerpo contra CD28(SA) (PG-LALA), CD28 (SA) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:62 y SEQ ID NO:64 (P1AD9289).

Molécula C: formato FAP(4B9)-CD28(SA) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento FAP(4B9) Fab (ojal) **(figura 1C)** que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 65, 66, 67 y 68 (P1AD4492).

Molécula D: formato FAP(4B9)-CD28(SA) 1+4, constructo biespecífico tetravalente anti-CD28 (SA) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del clon de FAP 4B9 se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del dominio Fc (VH: cadena botón, VL: cadena ojal) **(figura 1F**). La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62, 69 y 70 (P1AD9018).

Molécula E: formato FAP(4B9)-CD28(SA) 1+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (SA) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del clon de FAP 4B9 se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del dominio Fc (VH: cadena botón, VL: cadena ojal) **(figura 1D**). La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62, 71 y 72 (P1AD9011).

Molécula F: FAP(4B9)-CD28(SA) 2+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (SA) y bivalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, modificaciones cargadas en los fragmentos anti-CD28 Fab, fusión de VH de los fragmentos anti-FAP CrossFab con intercambio CH1/Ckappa al extremo terminal C del fragmento Fc **(figura 1E).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:65, 73 y 74 (P1AD4493).

Molécula G: FAP (4B9)-CD28 (SA) 2+1, constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (SA) y bivalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, “orientación clásica”, intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD28 CrossFab, modificación cargada en fragmentos anti-FAP Fab (**figura 1L**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 75, 76, 77 y 78 (P1AD5231).

Molécula H: FAP(4B9) - CD28(SA) C-01, 1+1 molécula biespecífica monovalente anti-CD28 (SA) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, “cabeza a cola”, intercambio VH/VL en fragmento anti-CD28 CrossFab, modificación cargada en aglutinante anti-FAP (**figura 1M**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 75, 77, 78 y 79 (P1AE2021).

Molécula I: FAP(4B9) - CD28(SA) C-04, 1+1 constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (SA) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de FAP 4B9 se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena botón, VL: cadena ojal) (**figura 1K**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: SEQ ID NO: 62, 72 y 80 (P1AE2236).

Molécula J: CEA-CD28(SA) 2+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (SA) y bivalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA CrossFab, modificaciones cargadas en los fragmentos anti-CD28 Fab, fusión de VH del fragmento anti-CEA CrossFab con intercambio CH1/Ckappa al extremo terminal C del fragmento Fc **(figura 1H).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 65, 81 y 82 (P1AE1195).

Molécula K: CEA-CD28(SA) 1+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (SA) y monovalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de CEA se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena de botón, VL: cadena ojal) **(figura 1G).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 62, 83 y 84 (P1AE1194).

Molécula L: constructo monovalente IgG CD28 (SA), monovalente anti-CD28 (SA) huIgG1 PG-LALA, en donde la cadena pesada de CD28 se expresa como una cadena Fc “ojal” en combinación con un fragmento Fc (botón) **(figura 1I).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 65, 85 y 86 (P1AD8944).

Molécula M: formato CEA-CD28(SA) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA crossFab (ojal) **(figura 1J)** que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 65, 66, 87 y 88 (P1AE3127).

Molécula N: mab 9.3 (PG-LALA), clon mAb9.3 en isotipo IgG1 PG-LALA humana **(como en la figura 1B).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:

89 y 90 (P1AD5142).

Molécula O: FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-03, constructo biespecífico huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento mAb9.3 Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento anti-FAP (ojal) **(como en la figura 1C).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 67, 68, 91 y 92 (P1AE2238).

Molécula P: FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 1+4, constructo biespecífico tetravalente anti-CD28 mAb9.3 y anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de FAP se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena de botón, VL: cadena ojal) **(como en la figura 1F).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 89, 93 y 94 (P1AD8969).

Molécula Q: FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 1+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 mAb9.3 y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de FAP se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena de botón, VL: cadena ojal) **(como en la figura 1D).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 89, 95 y 96 (P1AD8962).

Molécula R: FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 2+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 mAb9.3 y bivalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, modificaciones cargadas en el fragmento mAb9.3 FAP, fusión de VH del fragmento anti-FAP Fab con intercambio CH1/Ckappa CrossFab al extremo terminal C del fragmento Fc **(como en la figura 1E).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 97, 98 y 99 (P1AD8968).

Molécula S: FAP (4B9)-CD28 (mAb9.3) 2+1, constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (mAb9.3) y bivalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, “orientación clásica”, intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD28 (mAb9.3) CrossFab, modificación cargada en fragmentos anti-FAP Fab (**como en la figura 1L**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 76, 77, 100 y 101 (P1AD5560).

Molécula T: FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-02, constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (mAb9.3) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA CrossFab, “cabeza a cola”, intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD28 (mAb9.3) CrossFab, modificación cargada en el fragmento anti-FAP (**como en la figura 1M**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 78, 79, 100 y 101 (P1AE2022).

Molécula U: FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-05, constructo biespecífico monovalente anti-

CD28 (mAb9.3) y monovalente anti-FAP huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de FAP 4B9 se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena Fc botón, VL: cadena Fc ojal) (**como en la figura 1K**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 80, 89 y 96 (P1AE2237).

Molécula V: CEA-CD28(mAb9.3) 2+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (mAb9.3) y bivalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA CrossFab, modificaciones cargadas en el fragmento mAb9.3 Fab, fusión VH del fragmento anti-CEA CrossFab con intercambio CH1/Ckappa al extremo terminal C del fragmento Fc **(como en la figura 1H).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 82, 89 y 102 (P1AE1193).

Molécula W: CEA-CD28(mAb9.3) 1+2, constructo biespecífico bivalente anti-CD28 (mAb9.3) y monovalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA. Los dominios VH y VL del aglutinante de CEA se fusionaron al extremo terminal C de las respectivas cadenas del fragmento Fc (VH: cadena de botón, VL: cadena ojal) **(como en la figura 1G).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 89, 103 y 104 (P1AE1192).

Molécula X: IgG CD28 monovalente (mAb9.3), en donde la cadena pesada de CD28 se expresa como una cadena Fc “ojal” en combinación con un fragmento Fc (botón) **(como en la figura 1I).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 86, 105 y 106 (P1AD8938).

Además, se preparó una molécula triespecífica:

Molécula Y: FAP (4B9)-CD28(TGN1412)-CEA 1+1+1, constructo triespecífico monovalente anti-CD28 (TGN1412), monovalente anti-FAP y monovalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA CrossFab, intercambio VH/VL en el fragmento anti-CEA CrossFab (ojal), modificaciones cargadas en el fragmento anti-FAP Fab (botón) y en el fragmento anti-CD28 (botón) (**como en la figura 1N**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 87, 88, 388 y 389 (P1AE4064).

1.2 Producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente era impulsada por un

promotor de MPSV quimérico o un promotor de CMV. La poliadenilación era impulsada por una secuencia de señal poliA sintética ubicada en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia EBV OriP para la replicación autosómica.

Para la producción de los constructos C a W, células HEK293-EBNA que crecen en suspensión se cotransfectaron con los respectivos vectores de expresión usando polietilenimina como reactivo de transfección. Los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 EBNA. Las células se centrifugaron y el medio se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en medio CD CHO, se agregó PEI, la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se mezclaron con la solución PEI/ADN, se transfirieron a un matraz de agitación y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera al 5 % de CO_2. Luego de la incubación, se agregó medio Excell con suplementos (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Un día después de la transfección, se agregaron suplementos (alimentación) (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Los sobrenadantes celulares se recolectaron luego de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y se purificaron mediante métodos estándar.

Los constructos A, B y X fueron preparados por Evitria usando el sistema de vectores de su propiedad con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó medio sin suero y sin componentes animales de su propiedad (eviGrow y eviMake2) y el reactivo de transfección de su propiedad (eviFect). El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y se purificó mediante métodos estándar.

1.3 Purificación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. La elución se logró a pH 3,0 y luego mediante neutralización inmediata de la muestra. La

proteína se concentró y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

1.4 Datos analíticos de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

La concentración de proteínas de constructos purificados se determinó al medir la densidad óptica (OD) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción de masa calculado en función de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al*., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor usando un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido agregado se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna de exclusión por tamaño analítica (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de L-Arginina monoclorhidrato, pH 6,7 o 200 mM de KH_2PO_4, 250 mM de KCl pH 6,2, respectivamente). Una síntesis de los parámetros de purificación de todas las moléculas se proporciona en la **tabla 1.**

Tabla 1: Síntesis de la producción y purificación de moléculas biespecíficas o triespecíficas de unión al antígeno CD28

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
A	CD28(SA) (hu IgG4)	257	0 / 100 / 0	84,25
B	CD28(SA) hu IgG1 (PG-LALA)	390	0 / 97,3 / 2,7	84
C	FAP(4B9)-CD28(SA) 1+1	19,5	0,64 / 97,28 / 2,07	98,75
D	FAP(4B9)-CD28(TGN1412) 1+4	1,75	3,53 / 96,48 / 0	n.d.
E	FAP(4B9)-CD28(SA) 1+2	0,38	0,8 / 95,48 / 3,72	93,58
F	FAP(4B9)-CD28(SA) 2+2	18,2	1,4 / 98,6 / 0	91,42
G	FAP (4B9)-CD28 (SA) 2+1	2,66	3,79 / 94. 02 / 2,19	64
H	FAP(4B9) - CD28(SA) C-01	10,6	0 / 100 / 0	99,38
I	FAP(4B9) - CD28(SA) C-04	5,55	4,12 / 81,17 / 14,71	96,5
J	CEA-CD28(SA) 2+2	6,25	1 / 99 / 0	n.d.
K	CEA-CD28(SA) 1+2	5,8	0,5 / 99,5 / 0	64
L	IgG1 CD28 monovalente (SA)	38,5	0,2 / 99,6 / 0,2	99,3
M	CEA-CD28(SA) 1+1	14,3	0 / 100 / 0	99,18
N	CD28 (mAb 9.3) hu IgG1 (PG-LALA)	22,06	0 /100 / 0	88

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
O	FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-03	2,14	0 / 100 / 0	97,4
P	FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 1+4	7,6	1,2 / 98,8 / 0	97,6
Q	FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 1+2	16.	1 / 98,5 / 0,5	97,16
R	FAP(4B9)-CD28(mAb9.3) 2+2	3,9	0 / 95,5 / 4,5	87
S	FAP (4B9)-CD28 (mAb9.3) 2+1	2,63	2,1 / 96,3 / 1,6	90,55
T	FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-02	2,3	0 / 100 / 0	100
U	FAP(4B9) - CD28(mAb9.3) C-05	23,78	0,68 / 97,82 / 1,5	96,1
V	CEA-CD28(mAb9.3) 2+2	3,1	0 / 100 / 0	100
W	CEA-CD28(mAb9.3) 1+2	2,25	0 / 100 / 0	92,8
X	IgG1 monovalente CD28 (mAb9.3)	20,2	1,4 / 98,6 / 0	97,7
Y	FAP(4B9)-CD28(TGN1412)-CEA 1+1+1	1,57	0 /100 / 0	100

Ejemplo 2

Análisis de unión y cinético de anticuerpos biespecíficos de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

2.1 Unión de anticuerpos biespecíficos que actúan sobre CD28 y proteína de

activación de fibroblastos (FAP) a FAP- o CEA- y a células que expresan CD28

La unión de moléculas biespecíficas FAP-CD28 se evaluó usando proteína de activación de fibroblastos humana (huFAP) que expresa células 3T3-huFAP (clon 19). Esta línea celular se generó mediante la transfección de la línea de células NIH/3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC CRL-1658) con el vector de expresión pETR4921 para expresar huFAP en 1,5 µg/ml de selección de puromicina. La unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (línea de células de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano). La unión a CEACAM5 humana se evaluó mediante células MKN45 que expresaban CEA (línea celular de cáncer gástrico, DSMZ #ACC 409).

A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a 2,5E5/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat N.º 00-4222-26). $5x10^4$ células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 2 h a 4 °C con concentraciones en aumento de los constructos de CD28 que actúan sobre FAP (1 pM–100 nM). Luego, las células se lavaron tres veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 60 min más a 4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron una vez con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 100 µl de amortiguador FACS. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6.

Las moléculas FAP-CD28 fueron capaces de unirse a FAP humana así como a CD28 humano en las células de una manera dependiente de la concentración (**figuras 2B** y **2C** para algunos ejemplos). Como se esperaba, no se detectó unión con la IgG anti-DP47, lo que indicó que la detección de unión se debía a la unión específica a CD28 y FAP por parte de las respectivas porciones de direccionamiento.

Las moléculas CEA-CD28 también fueron capaces de unirse a CEA humano así como a CD28 humano en las células.

2.2 Análisis cinético de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos que actúan sobre CD28 y CEA

La afinidad (K_D) de ambas porciones de unión de los anticuerpos biespecíficos o

triespecíficos que comprendían anti-CEA (Medi-565) y anti-CD28 se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con antígeno huCD28-Fc biotinilado y Hu N(A2-B2)A-avi-His biotinilada inmovilizados en un chip NLC mediante captura de neutravidina.

Para la generación de un antígeno basado en CEACAM5 que contenía el epítopo para CEA(Medi-565), se generó una proteína quimérica que consistía en dos dominios de Ig CEACAM1 y dos dominios de Ig CEACAM5. Con base en la secuencia de CEACAM1, el segundo y el tercer dominio de CEACAM1 se reemplazaron por los dominios de CEACAM5 A2 y B2. Una etiqueta His y una etiqueta avi de extremo C se fusionaron para purificación y biotinilación específica de sitio. La proteína resultante se denominó Hu N(A2-B2)A-avi-His (SEQ ID NO: 169).

Inmovilización de antígenos recombinantes (ligando): Los antígenos se diluyeron con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005 % de Tween 20) hasta 10 µg/ml, luego se inyectaron a 30 µL/minuto en diversos tiempos de contacto, para lograr niveles de inmovilización de alrededor de 400, 800 y 1600 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las mediciones cinéticas de una etapa, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal, se inyectaron series de dilución de dos veces del anticuerpo biespecífico anti-CD28 que actuaba sobre CEA biespecífico purificado (rangos de concentración que variaban entre 50 y 3,125 nM) de manera simultánea a 50 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 150 s, y tiempos de disociación de 450 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco “en línea” para referencia. Las constantes de velocidad de asociación (kon) y las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibro (K_D) se calculó como la relación koff/kon. Los valores K_D calculados de un anticuerpo biespecífico que comprendía un dominio de unión al antígeno anti-CD28 y un dominio de unión al antígeno anti-CEA (molécula M) coincidían con los valores medidos de los respectivos constructos monoespecíficos. Los datos cinéticos y termodinámicos se resumen en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Análisis cinético y termodinámico de CEA-CD28(SA) 1+1 (molécula M)

Porción de unión	k_{on} (1/(s*M)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
Anti-CEA	4,13 exp5	1,2 exp-4	0,29
Anti-CD28 (TGN1412)	3,13 exp5	3,76 exp-4	1,2

Ejemplo 3

Generación y caracterización de variantes de CD28 (SA) carentes de puntos calientes y con afinidad reducida

3.1 Eliminación de un residuo de cisteína sin aparear, residuos de triptófano, un sitio de desamidación y generación de variantes de CD28 (SA) con afinidad reducida

Como parte de la caracterización de aglutinante detallada, se realizó un análisis computacional de las secuencias de dominio variable de CD28(SA). Este análisis reveló una cisteína sin aparear en la región CDR2 de VH (posición 50, numeración de Kabat), residuos de triptófano en CDR3 de VH (posición 100a, numeración de Kabat) y CDR1 de VL (posición 32, numeración de Kabat), y un potencial sitio de desamidación de asparagina en CDR2 de VH (posición 56, numeración de Kabat). Aunque la oxidación del triptófano es un proceso relativamente lento y puede evitarse al agregar compuestos reductores, la presencia de cisteínas sin aparear en un dominio variable de anticuerpo puede ser crítica. Las cisteínas libres son reactivas y pueden formar enlaces estables con otras cisteínas sin aparear de otras proteínas o componentes de la célula o el medio. Como consecuencia, eso puede producir un producto heterogéneo e inestable con modificaciones desconocidas que son potencialmente inmunógenas y, por lo tanto, pueden presentar un riesgo para los pacientes. Además, la desamidación de asparagina y la formación resultante de iso-aspartato y succinimida pueden afectar la estabilidad *in vitro* y las funciones biológicas *in vivo*. Un análisis de las estructuras de cristal del aglutinante murino de origen 5.11A reveló que C50 no participaba en la unión a CD28 humano y, por lo tanto, puede reemplazarse por un aminoácido similar, tal como serina, sin afectar la afinidad por CD28 (**tabla 6**, variante 29). Ambos residuos de triptófano así

como de asparagina en la posición 50, no obstante, son cercanos a o participan en la interfase de unión y un remplazo por un aminoácido similar puede, por ende, producir una reducción de la afinidad de unión. En este ejemplo, se intentó particularmente reducir la afinidad de CD28(SA) por CD28 humano debido al siguiente motivo: La afinidad de CD28(SA) se encuentra en el rango de 1-2 nM con una semivida de unión de alrededor de 32 minutos. Esta fuerte afinidad puede producir un efecto de hundimiento en tejido que contiene grandes cantidad de células que expresan CD28, tal como tejido linfático y sangre, al inyectarse por vía intravenosa en los pacientes. Como consecuencia, el direccionamiento específico de sitio del compuesto por medio del/los componente(s) de direccionamiento FAP y/o CEA puede reducirse y la eficacia del constructo puede disminuir. A fin de minimizar dicho efecto, varias variantes de VH y VL se generaron para reducir las afinidades hasta diferentes grados (**figuras 3A y 3C**). Además de las posiciones mencionadas previamente que representan potenciales puntos calientes de estabilidad, los residuos adicionales que participaban de manera directa o indirecta en la unión a CD28 humano se reemplazaron por el aminoácido de línea germinal murino original o por un aminoácido similar. Además, las CDR de CD28(SA) VL y VH también se injertaron en las respectivas secuencias estructurales de trastuzumab (**figuras 3B y 3D**). Luego, varias combinaciones de variantes de VH y VL se expresaron como constructos tipo IgG anti-CD28 de un brazo monovalente y la unión se caracterizó mediante SPR.

3.2 Análisis de las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) de variantes anti-CD28 de un brazo reducidas mediante SPR

A fin de caracterizar las variantes de aglutinante anti-CD28 en una primera etapa, todos los aglutinantes se expresaron como constructos tipo IgG de un brazo monovalente (**figura 4A**). Este formato se seleccionó a fin de caracterizar la unión a CD28 en un modelo 1:1. 5 días después de la transfección en células HEK, el sobrenadante se recolectó y el título de los constructos expresados se determinó.

La velocidad de disociación de las variantes de aglutinante anti-CD28 se determinó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con antígeno huCD28-Fc biotinilado inmovilizado en chips NLC mediante captura de neutravidina. Para la inmovilización de antígeno recombinante (ligando), huCD28-Fc se diluyó con PBST (solución salina amortiguada con fosfato con Tween 20 que consistía en 10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005 % de Tween 20) hasta concentraciones que variaban de 100 a 500 nM, luego se inyectaron a 25 µL/minuto en diversos tiempos de contacto. Esto produjo niveles de

inmovilización entre 1000 y 3000 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical.

Para mediciones cinéticas de una etapa, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal. Con base en el título de los sobrenadantes producidos, las IgG de un brazo monovalentes se diluyeron con PBST para obtener series de dilución de dos veces que variaban de 100 nM a 6,25 nM. La inyección se realizó simultáneamente a 50 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 120 s y tiempos de disociación de 300 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco “en línea” para referencia. Dado que la interacción de unión se midió con IgG de un brazo monovalentes de sobrenadante sin purificación y caracterización bioquímica, solo las velocidades de disociación de la interacción proteína:proteína se usaron para conclusiones adicionales. Las velocidades de disociación se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste de los sensogramas de disociación. Los valores de constantes de velocidad de disociación (k_{off}) de todos los clones se resumen en la **tabla 3.** La comparación de las variantes producidas reveló valores de k_{off} con una disminución de hasta 30 veces en comparación con la secuencia de origen.

Tabla 3: Síntesis de todas las variantes anti-CD28 monovalentes expresadas con valores de constantes de velocidad de disociación (k_{off})

Variantes de aglutinante	Tapir ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	k_{off} (10^{-4}/M)
CD28(SA)_variante_1 (CD28 de origen)	P1AE4441	112	65	126	3,0
CD28(SA)_variante_2	P1AE3058	113	120	126	N/A
CD28(SA)_variante_3	P1AE3059	113	121	126	N/A
CD28(SA)_variante_4	P1AE3060	113	122	126	N/A
CD28(SA)_variante_5	P1AE3061	113	65	126	N/A
CD28(SA)_variante_6	P1AE3062	114	120	126	N/A
CD28(SA)_variante_7	P1AE3063	114	121	126	100
CD28(SA)_variante_8	P1AE3064	114	122	126	68
CD28(SA)_variante_9	P1AE3065	114	123	126	78
CD28(SA)_variante_10	P1AE3066	114	124	126	N/A
CD28(SA)_variante_11	P1AE3067	114	65	126	37
CD28(SA)_variante_12	P1AE3068	115	125	126	2,4
CD28(SA)_variante_13	P1AE3069	115	65	126	1,9
CD28(SA)_variante_14	P1AE3070	116	120	126	100
CD28(SA)_variante_15	P1AE3071	116	121	126	24
CD28(SA)_variante_16	P1AE3072	116	122	126	10
CD28(SA)_variante_17	P1AE3073	116	123	126	14
CD28(SA)_variante_18	P1AE3074	116	124	126	82
CD28(SA)_variante_19	P1AE3075	116	65	126	2,9
CD28(SA)_variante_20	P1AE3076	117	120	126	N/A
CD28(SA)_variante_21	P1AE3077	117	121	126	N/A
CD28(SA)_variante_22	P1AE3078	117	122	126	61
CD28(SA)_variante_23	P1AE3079	117	65	126	43

Variantes de aglutinante	Tapir ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	k_{off} (10^{-4}/M)
CD28(SA)_variante_24	P1AE3080	118	120	126	80
CD28(SA)_variante_25	P1AE3081	118	121	126	3,51
CD28(SA)_variante_26	P1AE3082	118	122	126	9,7
CD28(SA)_variante_27	P1AE3083	118	123	126	14
CD28(SA)_variante_28	P1AE3084	118	124	126	69
CD28(SA)_variante_29	P1AE3085	118	65	126	2,5
CD28(SA)_variante_30	P1AE3086	119	125	126	3,22
CD28(SA)_variante_31	P1AE3087	119	65	126	2,5

La unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (línea de células de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61). Este ensayo de unión se describe en el ejemplo 4 a continuación. Los constructos variantes de CD28 tipo IgG de un brazo monovalente presentaron diferencias en la unión, como se puede observar a partir de las **figuras 4A a 4C**.

3.3 Preparación y análisis cinético de variantes biespecíficas de afinidad anti-CD28 que actúan sobre FAP

Con base en el análisis de velocidad de disociación y el estudio de unión en células que expresan CD28, varias combinaciones de variantes anti-CD28 VH y VL con diferentes intensidades de unión se seleccionaron y se expresaron como moléculas biespecíficas huIgG1 PG-LALA CrossFab que actúan sobre FAP (para combinaciones de SEQ ID NO:s ver **tabla 4**). Los constructos resultantes en formato 1+1 (**figura 4B**) se purificaron y se realizó un análisis bioquímico (**tabla 5**).

Tabla 4: Síntesis de todas las variantes biespecíficas anti-CD28 que actúan sobre FAP 1+1 expresadas

Variantes de aglutinante	Tapir ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
FAP (4B9)-CD28 (CD28(SA)_Variante 8) 1+1	P1AE3131	67	68	114	122

Variantes de aglutinante	Tapir ID	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 11) 1+1	P1AE3132	67	68	114	65
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 12) 1+1	P1AE3133	67	68	115	125
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 15) 1+1	P1AE3134	67	68	116	121
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 16) 1+1	P1AE3135	67	68	116	122
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 17) 1+1	P1AE3136	67	68	116	123
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 19) 1+1	P1AE3137	67	68	116	65
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 23) 1+1	P1AE3138	67	68	117	65
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 25) 1+1	P1AE3139	67	68	118	121
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 27) 1+1	P1AE3140	67	68	118	123
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 29) 1+1	P1AE3141	67	68	118	65

Tabla 5: Síntesis de la producción y purificación de variantes anti-CD28 que actúan sobre FAP

TaPIR ID	Moléculas biespecíficas	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/ LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
P1AE3131	FAP (4B9)-CD28 (CD28(SA)_Variante 8) 1+1	11,8	0,1 / 98,5 / 1,4	100
P1AE3132	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 11) 1+1	8,1	0,5 / 97,4 / 2,1	100

TaPIR ID	Moléculas biespecíficas	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/ LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
P1AE3133	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 12) 1+1	6,1	0 / 100 / 0’	100
P1AE3134	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 15) 1+1	9,2	0 / 100 / 0	100
P1AE3135	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 16) 1+1	0,4	0 / 100 / 0	97
P1AE3136	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 17) 1+1	1,35	0 / 78,7 / 21,3	87
P1AE3137	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 19) 1+1	2,6	0 / 100 / 0	100
P1AE3138	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 23) 1+1	15,5	0 / 97,5 / 2,5	98
P1AE3139	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 25) 1+1	5,4	0 / 88,7 / 11,3	100
P1AE3140	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 27) 1+1	9,7	0 / 98,3 / 1,7	96
P1AE3141	FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 29) 1+1	1,76	1 / 99 / 0	96,3

La afinidad de (K_D) de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno producidas por CD28 se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con antígeno huCD28-Fc biotinilado inmovilizado en chips NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos recombinantes (ligando): El antígeno se diluyó con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005 % de Tween 20) hasta 10 µg/ml, luego se inyectó a 30 µL/minuto en diversos tiempos de contacto, para

lograr niveles de inmovilización de alrededor de 200, 400 u 800 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las mediciones cinéticas de una etapa, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal, se inyectaron series de dilución de dos veces de variantes biespecíficas de afinidad anti-CD28 que actúan sobre FAP purificadas (rangos de concentración que variaban entre 50 y 3,125 nM) de manera simultánea a 50 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 150 s, y tiempos de disociación de 450 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibro (K_D) se calculó como la relación k_{off}/k_{on}. Los clones analizados revelaron valores de K_D en un rango amplio (entre 1 y 25 nM). Los datos cinéticos y termodinámicos se resumen en la **tabla 6.**

Tabla 6: Análisis cinético y termodinámico de variantes anti-CD28 que actúan sobre FAP expresadas

Molécula biespecífica	k_{on} (1/(s*M)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
de origen	3,79 exp5	3,6 exp-4	1
FAP (4B9)-CD28 (CD28(SA)_Variante 8) 1+1	2,19 exp5	5,21 exp-3	23,8
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 11) 1+1	2,3 exp5	2,87 exp-3	12,5
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 12) 1+1	2,6 1exp5	2,67 exp-4	1
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 15) 1+1	2,59 exp5	1,84 exp-3	7,1
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 16) 1+1	1,87 exp5	9,94 exp-4	5,3
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 17) 1+1	3,38 exp5	1,25 exp-3	3,7

FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 19) 1+1	2,8 exp5	3,04 exp-4	1,1
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 23) 1+1	2,11 exp5	3,42 exp-3	16,3
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 25) 1+1	2,38 exp5	3,96 exp-4	1,7
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 27) 1+1	2,27 exp5	1,21 exp-3	5,4
FAP (4B9) - CD28 (CD28(SA)_Variante 29) 1+1	2,72 exp5	3,07 exp-4	1,1

Ejemplo 4

Unión de IgG agonistas de CD28 monovalentes y anticuerpos agonistas contra CD28 que actúan sobre FAP a células que expresan CD28 y que expresan FAP

La unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (línea de células de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano). A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a $2{,}5x10^5$/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat. N.º 00-4222-26). $5x10^4$ células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 2 h a 4 °C con concentraciones en aumento de aglutinantes de CD28 (1 pM–100 nM). Luego, las células se lavaron tres veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 60 min más a 4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson lmmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron una vez con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 100 ul de amortiguador FACS. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6.

Los constructos variantes de CD28 tipo IgG de un brazo monovalente presentaron diferencias en la unión, como se puede observar a partir de las **figuras 4A a 4C**. Además,

se determinó la unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD28 que actúan sobre FAP en formato 1+1 a células CHO que expresaban CD28 humano. Los valores de K_D para los diferentes constructos 1+1 con variantes de CD28 seleccionadas se muestran en la **tabla 7** a continuación o en los correspondientes gráficos de las **figura 4D** y **4E**.

Tabla 7: Unión de constructos 1+1 anti-CD28 que actúan sobre FAP a células CHO que expresaban CD28 humano

Aglutinante	TAPIR	K_D (nM)
TGN1412	P1AD4492	1
variante 8	P1AE3131	23,8
variante 11	P1AE3132	12,5
variante 12	P1AE3133	1
variante 15	P1AE3134	7,1
variante 16	P1AE3135	5,3
variante 17	P1AE3136	3,7
variante 19	P1AE3137	1,1
variante 23	P1AE3138	16,3
variante 25	P1AE3139	1,7
variante 27	P1AE3140	5,4
variante 29	P1AE3141	1,1

La unión de anticuerpos biespecíficos anti-CD28 que actúan sobre FAP en formato 1+1 a células 3T3-huFAP que expresan FAP (clon 19) también se determinó como se describe en el ejemplo 2,1 y se muestra en los correspondientes gráficos de la **figura 4F** y **4G**.

Ejemplo 5

Unión de anticuerpos agonistas contra CD28 que actúan sobre CEA a células que expresan CD28

La unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (la unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD,

Software FACS Diva)) como se describe en el ejemplo 4. Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6. Las curvas de unión para los diferentes constructos 1+1 con las variantes de CD28 seleccionadas se muestran en la **figura 16**.

Ejemplo 6

Caracterización funcional *in vitro* de CD28 de direccionamiento y proteína de activación de fibroblastos (FAP) o antígeno carcinoembrionario (CEA)

Varios ensayos celulares *in vitro* se realizaron con PBMC humanas primarias para evaluar la actividad de CD28(SA) y moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre FAP en presencia y ausencia de señales de TCR proporcionadas por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB). La proliferación de linfocitos T, la secreción de citocina y la inactivación de células tumorales determinadas mediante citometría de flujo, ELISA de citocina y generación de imágenes de células vivas se obtuvieron como lecturas.

1. La actividad de IgG4 superagonista de CD28(SA) original se evaluó usando un sistema de precultivo de alta densidad descrito previamente para restaurar la sensibilidad de linfocitos T derivados de sangre periférica hacia superagonismo mediado por CD28 (Römer *et al*., 2011).

2. La funcionalidad de las moléculas de CD28 dirigidas en ausencia de señales de TCR se evaluó en un ensayo de cocultivo de PBMC humana primaria, en donde las moléculas de CD28 que actúan sobre FAP o CEA se reticularon mediante unión simultánea a CD28 humano en linfocitos T y FAP humano, expresados en células 3T3-huFAP (línea celular de origen ATCC #CCL-92, modificada para sobreexpresar de manera estable FAP humano) o células de melanoma MV3 que expresan MCSP y FAP, o células de cáncer gástrico MKN45 que expresan CEA, respectivamente.

3. La funcionalidad de las moléculas de CD28 que actúan sobre FAP en presencia de señales de TCR se evaluó como se describió anteriormente, con la presencia adicional de una molécula de TCB, reticulada mediante unión simultánea a CD3 en linfocitos T y CEA humano en células de cáncer gástrico MKN45, células de cáncer de colon Lovo, células de cáncer de colon HT-29, o MCSP, expresado en células de melanoma MV3.

Aislamiento de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación de gradiente de densidad a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos de sangre heparinizada obtenida de capa leucocítica (Blutspende Zürich). 25 ml de sangre (diluidos 1:2 en PBS) se colocaron en capas sobre 15 ml de Lymphoprep (STEMCELL technologies, Cat. N.º 07851) y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 25 min a 845 xg sin freno. La interfase que contiene PBMC se recolectó en tubos de 50 ml con una pipeta de 10 ml. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 min a 611 xg. El sobrenadante se descartó, el pelet se volvió a suspender en 50 ml de PBS y se centrifugó durante 5 min a 304 xg. La etapa de lavado se repitió, con centrifugación a 171 xg. Las células se volvieron a suspender en RPMI 1640 Glutamax (que contenía 5 % de suero humano, piruvato de sodio, NEAA, 50 μM de 2-mercaptoetanol, penicilina/estreptomicina) y se procesaron para análisis funcional adicional de acuerdo con el protocolo de ensayo respectivo.

Precultivo de alta densidad de PBMC y evaluación *in vitro* de activación de linfocitos T por medio del superagonista de CD28 CD28(SA)

Para restaurar la sensibilidad de los linfocitos T humanos con respecto al superagonismo de CD28 mediado por TGN1412, las PBMC se precultivaron a alta densidad (HD) (Römer *et al*, 2011) antes de evaluar los efectos de los anticuerpos superagonistas contra CD28. En resumen, las PBMC se ajustaron a 1E7 células/ml en medio completo (RPMI 1640 Glutamax, 5 % de suero humano, piruvato de sodio, NEAA, 50 uM 2-Mercaptoetanol, penicilina/estreptomicina) y se cultivaron a 1,5 ml/cavidad en una placa de 24 cavidades durante 48 horas a 37 °C, 5 % de CO_2. Las células se volvieron a recolectar, se lavaron en medio completo, se centrifugaron a 550 xg durante 5 min y se ajustaron hasta la densidad celular deseada necesaria para la caracterización funcional. Para evaluar la proliferación de linfocitos T, las PBMC se marcaron con CFSE y se midió la dilución de CFSE como representante de proliferación de linfocitos T luego de 5 días de estimulación. En resumen, las células se ajustaron a $2x10^7$/ml en PBS y se marcaron con 2,5 μM de tintura de proliferación de CFSE (LifeTechnologies, Cat. N.º 65-0850-84) durante 6 minutos a 37 °C, 5 % de CO_2. Las células se lavaron una vez en medio completo, seguido por 2 etapas de lavado en PBS. Para la estimulación con TGN1412, las PBMC se ajustaron a $2x10^6$/ml en medio completo y $1x10^5$ células se distribuyeron en cada cavidad de una placa de 96 cavidades de fondo plano y se estimularon con concentraciones en aumento de TGN1412 (0,0002 nM a 10 nM, triplicados). La dilución de CFSE se evaluó

mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se centrifugaron a 550 xg durante 5 min y se lavaron con PBS. La dilución de CFSE se evaluó mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se centrifugaron a 550 xg durante 5 min y se lavaron con PBS. La tinción superficial para CD8 (BV711 anti-CD8a humano, BioLegend #301044), CD4 (PE-Cy7 anti-CD4 humano, BioLegend # 344612) se realizó de acuerdo con las indicaciones de los proveedores. Las células se lavaron luego dos veces con 150 µl/cavidad de PBS, y se volvieron a suspender en 200 µl/cavidad de amortiguador FACS, y se analizaron usando BD FACS Fortessa. La secreción de citocina se midió en el día 5 luego de la activación mediante análisis ELISA de citocina (huTNFα, DuoSet #DY210-05 y huIFNγ, DuoSet #DY285-05) o múltiple de citocina (ensayo Human Cytokine 17-plex, Bio-Rad #M5000031YV) a partir de sobrenadantes de cultivo.

Evaluación *in vitro* de proliferación de linfocitos T y secreción de citocina por medio de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre FAP en ausencia y presencia de señales de TCB

Se usaron linfocitos T pan como células efectoras y se aislaron de PBMC mediante MACS, usando el kit de aislamiento de linfocitos T pan (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para medir la activación de linfocitos T mediante moléculas biespecíficas de unión al antígeno FAP-CD28 en ausencia de TCB, los linfocitos T pan marcados con CFSE se cocultivaron con $3x10^4$/cavidad de células 3T3-huFAP o 3T3 de origen que carecían de expresión de FAP (3T3-WT), sembradas el día previo en placas de 96 cavidades de fondo plano. Se agregaron moléculas biespecíficas de unión al antígeno FAP-CD28 en concentraciones en aumento (0,0002 nM – 10 nM, triplicados).

Para medir la proliferación de linfocitos T en presencia de una señal de TCB, los linfocitos T pan marcados con CFSE se incubaron con $3x10^4$ células MV3 que expresaban FAP y MCSP/cavidad, sembradas el día previo en placas de 96 cavidades de fondo plano, con concentraciones en aumento de moléculas biespecíficas de unión al antígeno FAP-CD28 (0,0002 nM – 10 nM, triplicados) y una concentración fija de MCSP-TCB (5 pM, P1AD2189). Como controles, se incluyeron cavidades que contenían solamente TCB.

La dilución de CFSE se evaluó mediante citometría de flujo, y la secreción de citocina se midió 5 días después de la activación mediante análisis ELISA de citocina (huTNFα, DuoSet #DY210-05 y huIFNγ, DuoSet #DY285-05) o múltiple de citocina (ensayo Human Cytokine 17-plex, Bio-Rad #M5000031YV) a partir de sobrenadantes de cultivo.

La preparación del anticuerpo biespecífico anti-MCSP/anti-CD3 (MCSP-TCB) usado en el experimento se describe en WO 2014/131712 A1.

El superagonismo de CD28(SA) requiere reticulación de FcγRIIb

El precultivo de alta densidad de PBMC restaura el superagonismo de CD28(SA)

A fin de comprender el mecanismo de acción de CD28(SA), se validó el precultivo a alta densidad (HD) de PBMC como un protocolo descrito anteriormente para restaurar la capacidad de linfocitos T derivados de PBMC para responder al superagonismo (Römer et al., 2011) de CD28 mediado por TGN1412. Como se ilustra en las **figuras 5A** y **5B**, CD28(SA) IgG4 (*P1AE1975*) induce la proliferación de linfocitos T de PBMC (**figura 5A**) y la producción de citocina (**figura 5B**) de una manera dependiente de la concentración 5 días después de la estimulación solamente en PBMC sometidas a precultivo de HD, mientras que las PBMC nuevas se mantuvieron sin sensibilidad. Se concluyó que el protocolo publicado previamente para restaurar la sensibilidad de los linfocitos T con respecto a CD28(SA) *in vitro* (Römer et al., 2011) podía reproducirse.

La actividad superagonista de CD28(SA) requiere reticulación por medio de FcγRIIb - El bloqueo de FcγRIIb elimina la funcionalidad de CD28(SA)

La literatura publicada previamente indica que TGN1412 potencialmente depende de la reticulación de FcγRIIb. A fin de comprender el vínculo entre el precultivo de HD de PBMC y la dependencia Fc de la funcionalidad de CD28(SA), los niveles de expresión de FcγRIIb en PBMC se evaluaron mediante citometría de flujo antes y después del precultivo de HD. Como se ilustra en la **figura 5C**, no se observó expresión de FcγRIIb en monocitos de PBMC nuevos, mientras que 96,8 % de los monocitos expresaron FcγRIIb luego de 2 días de precultivo de HD. El bloqueo mediado por anticuerpo de FcγRIIb en los posteriores ensayos de proliferación de linfocitos T anuló por completo la proliferación de linfocitos T luego de la estimulación con CD28(SA), según se midió después de 5 días en cultivo (**figura 5D**). En un método alternativo, una variante con Fc silenciosa de CD28(SA) que tiene la mutación P329G-LALA (*CD28(SA) IgG1 PG-LALA: P1AD9289*) no presentó función superagonista (**figura 6A**). Estos datos confirmaron que el superagonismo de CD28 mediado por CD28(SA) depende de la reticulación mediante FcγRIIb.

La adición de una porción que actúa sobre el tumor para el direccionamiento de FAP a CD28(SA) con Fc silenciosa restaura el superagonismo, que depende entonces de la presencia de la diana tumoral

Dado dicho superagonismo de CD28 por parte de TGN1412 depende de la reticulación de FcγRIIb, se especuló que la dependencia de FcR podía redirigirse a tumores mediante la introducción de (i) una mutación P329G-LALA de silenciamiento de Fc y (ii) una porción de direccionamiento que se reticula con un antígeno tumoral expresado en la superficie. A fin de probar dicha hipótesis, una porción que actúa sobre FAP se agregó como fusión de extremo C a TGN1412 con Fc silenciosa (*FAP-CD28 1+2 SA: P1AD9011*). Dado que la reticulación de FcR no era necesaria para este método, las PBMC no se sometieron a precultivo de HD. En su lugar, las PBMC nuevas se cocultivaron con 3T3-huFAP o 3T3-WT durante 5 días en presencia de concentraciones en aumento de FAP-CD28 (*P1AD9011*), y la proliferación de linfocitos T se evaluó mediante dilución de CFSE mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **figura 6B**, la introducción de porción de unión a FAP permitió la proliferación de linfocitos T exclusivamente en presencia de FAP. Se concluyó que el superagonismo puede dirigirse selectivamente a antígenos tumorales mediante silenciamiento de Fc y la adición de una porción que actúa sobre el tumor.

Los anticuerpos agonistas contra CD28 convencionales (clon 9.3) no se comportan de manera superagonista en formatos biespecíficos que actúan sobre el tumor

En la literatura se informaron dos tipos de anticuerpos agonistas contra CD28: los anticuerpos superagonistas contra CD28, tales como TGN1412, pueden activar de manera autónoma los linfocitos T sin la necesidad de una señal adicional proporcionada por TCR. Estos anticuerpos se denominan superagonistas, dado que superan la funcionalidad de los ligandos agonistas de CD28 naturales CD80 y CD86, que dependen estrictamente de la presencia de una señal de TCR para mejorar la función de los linfocitos T. En contraste con los anticuerpos superagonistas, tales como TGN1412, los anticuerpos agonistas convencionales, tales como clon mab 9.3, no pueden activar los linfocitos T de manera autónoma, pero, al igual que los ligandos de CD28 naturales, necesitan una señal de TCR adicional para mejorar la actividad de los linfocitos T. A fin de evaluar el efecto de los agonistas de CD28 de direccionamiento a antígenos tumorales en mayor detalle, se generaron moléculas FAP-CD28 adicionales: (i) una molécula superagonista (SA) con 2 porciones de unión a CD28 (TGN1412) y 2 porciones de unión a FAP = formato 2+2 SA (*P1AD4493*), (ii) un agonista convencional (CA) con 2 porciones de unión a CD28 (clon 9.3) y 1 o 2 porciones de unión a FAP, respectivamente: 2+2 CA (*P1AD8968*), 1+2 CA (*P1AD8962*). Las PBMC nuevas se cocultivaron con 3T3-huFAP o 3T3-WT durante 5 días en presencia de concentraciones en aumento de moléculas que actúan sobre FAP, y la proliferación de linfocitos T se evaluó mediante dilución de CFSE

mediante citometría de flujo. Como se ilustra en las **figuras 7A** a **7D,** solo los aglutinantes superagonistas pudieron activar los linfocitos T. Además, la activación de linfocitos T por medio de los constructos superagonistas descritos depende estrictamente de la presencia de FAP (**figura 7B**), como se demostró mediante la ausencia de activación de linfocitos T en ausencia de FAP (**figura 7D**). De acuerdo con estos datos, también la secreción de citocina solo se observó en constructos que contenían los anticuerpos superagonistas contra CD28(SA), pero no el anticuerpo agonista convencional 9.3 (**figura 7E**). Se concluyó que solo los anticuerpos superagonistas contra CD28 desencadenan la activación de linfocitos T autónoma en formatos de anticuerpos biespecíficos que actúan sobre el tumor, mientras que los mismos formatos con aglutinantes 9.3 convencionales no son superagonistas.

Ejemplo 7

Evaluación *in vitro* de la inactivación de células tumorales por medio de moléculas CD28 que actúan sobre el tumor en ausencia o presencia de TCB

A fin de evaluar la capacidad de moléculas biespecíficas de unión al antígeno FAP-CD28 o CEA-CD28 para lograr la inactivación de células tumorales o soportar la inactivación de células tumorales mediada por TCB, los linfocitos T pan purificados sirvieron como células efectoras y las células MV3 que expresaban RFP y células MKN45, respectivamente, sirvieron como dianas tumorales.

A fin de evaluar la inactivación de células tumorales MV3, 5000 células diana MV3 sembradas el día anterior se cocultivaron con $1x10^5$ linfocitos T pan por cavidad en placas de 96 cavidades de fondo plano (E:T 20:1), en presencia de 5 pM MCSP-TCB (P1AD2189) solo o en combinación con 10 nM de molécula biespecífica de unión al antígeno FAP-CD28. A fin de evaluar la inactivación de células tumorales MV3, 5000 células diana MV3 sembradas el día anterior se cocultivaron con $1x10^5$ linfocitos T pan por cavidad en placas de 96 cavidades de fondo plano (E:T 20:1), en presencia de 2 nM de FAP-CD28. A fin de evaluar la inactivación de células tumorales MKN45, 5000 MKN45, sembradas el día anterior, se cocultivaron con $1x10^5$ linfocitos T pan por cavidad en placas de 96 cavidades de fondo redondo en presencia de 2 nM de CEA-CD28. La inactivación de células diana se controló durante 90 horas, usando el sistema de generación de imágenes de células vivas IncuCyte (Essen Biosciences), que capturaba 4 imágenes por cavidad cada 3 horas. Los recuentos de objetos RFP+ por imágenes (según se evaluó mediante el *software* IncuCyte ZOOM, Essen Biosciences) en el tiempo

sirvió como representante de muerte de células diana. La inactivación de células diana mediada por anticuerpo se distinguió de la muerte de células diana espontánea al controlar los recuentos de células diana en presencia de linfocitos T efectores solos en el tiempo (=control inicial). La inactivación se calculó como 100 – x, en donde x es % de dianas con respecto al control inicial. Se realizaron análisis estadísticos usando la prueba t de Student, que comparaban las áreas bajo las curvas (AUC) de % de inactivación en el tiempo.

FAP-CD28 induce la inactivación de células diana en el formato 1+2, pero solo con aglutinantes de CD28 superagonistas, no con aglutinantes agonistas de CD28 convencionales

Se evaluó la capacidad de las moléculas FAP-CD28 para inducir la inactivación de células tumorales. Como se ilustra en las **figuras 8A** a **8D**, el cocultivo de linfocitos T derivados de PBMC con células de melanoma MV3 que expresaban FAP en presencia de FAP-CD28 durante 90 horas produjo la inactivación de células MV3 exclusivamente por medio de FAP CD28(SA) en formato 1+2 (P1AD9011) y fue comparable con la inducción de inactivación lograda por TCB que actúa sobre FAP (7). No se observó inactivación con FAP-CD28(SA) en formato 2+2 (P1AD4493) así como FAP-CD28 con anticuerpo agonista 9.3 contra CD28 convencional (P1AD8968 y P1AD8962). Se concluyó que además de la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocina, un FAP-CD28 en formato 1+2 con aglutinantes superagonistas también podía desencadenar la inactivación de células diana, en comparación con TCB.

CEA-CD28 induce la inactivación de células diana en el formato 1+2 y 2+2, pero solo con anticuerpos superagonistas, no con anticuerpos agonistas contra CD28 convencionales

En un método alternativo, se usaron moléculas agonistas CD28 que actúan sobre CEA en los formatos 2+2 SA (*P1AE1195*), 1+2 SA (*P1AE1194*), 2+2 CA (*P1AE1193*) y 2+1 CA (*P1AE1192*) a fin de evaluar su capacidad para inducir la inactivación de células diana. Los linfocitos T de PBMC se cocultivaron con células MKN45 que expresaban CEA en presencia de CEA-CD28 en los formatos mencionados previamente durante 90 h. Ambos formatos que contenían aglutinantes de CD28 superagonistas pudieron inducir la inactivación de células MKN45 que expresaban CEA (**figura 9A** y **9B**). Se especuló que la discrepancia entre la capacidad de FAP-CD28(SA) 2+2 y CEA-CD28 (SA) 2+2 para inactivar sus respectivas células diana se basa en las discrepancias de los niveles de expresión diana en células MKN45 en comparación con células MV3. Precisamente,

datos internos confirmaron que los niveles de expresión de FAP de las células MV3 son 10x menores que los niveles de expresión de CEA de las células MKN45. Por lo tanto, en células MV3, los sitios de unión a la diana tumoral pueden ser limitantes, y la inactivación de células MV3 requiere la ocupación eficaz de FAP en comparación con CD28, lo que resulta conveniente en el formato 1+2 (es decir, 1 sitio de unión a FAP reticula 2 sitios de unión a CD28) en comparación con el formato 2+2 (es decir, 2 sitios de unión a FAP son necesarios para la reticulación de 2 sitios de unión a CD28).

El superagonismo de CD28 por parte de aglutinantes de TGN1412 depende de la multivalencia del aglutinante de CD28 – Los aglutinantes monovalentes no son superagonistas

A fin de investigar adicionalmente la naturaleza del superagonismo de CD28, se evaluó si los aglutinantes de CD28 TGN1412 monovalentes presentan un comportamiento superagonista en un formato biespecífico que actúa sobre el tumor. Los linfocitos T de PBMC se cocultivaron con células 3T3-huFAP y se incubaron con concentraciones en aumento de FAP-CD28 1+2 SA con bivalencia de CD28 (*P1AD9011*) y FAP-CD28 1+1 SA con monovalencia de CD28 (*P1AD4492*). Como se muestra en la **figura 10A**, FAP-CD28 con unión a CD28 monovalente (*P1AD4492)* no pudo inducir la proliferación de linfocitos T, a diferencia del constructo bivalente de CD28 (*P1AD9011*). Consecuentemente, la regulación ascendente de los marcadores de activación de linfocitos T CD69 y CD25 solo se observó con la bivalencia de CD28 (**figura 10B** y **10C**, respectivamente). En conclusión, el superagonismo mediado por TGN1412 no solo dependía de la reticulación mediante receptores Fc sino que también requería la multivalencia del aglutinante de CD28.

En conclusión, se pudo establecer que el superagonismo de CD28 puede dirigirse específicamente a antígenos tumorales mediante silenciamiento de Fc e introducción de un dominio de unión al antígeno capaz de unirse de manera específica a un antígeno asociado al tumor. Además, los anticuerpos biespecíficos que actúan sobre el tumor solo eran superagonistas cuando comprendían aglutinantes basados en CD28(SA) y no cuando comprendían aglutinantes agonistas convencionales (clon 9.3). Además, el superagonismo requiere la multivalencia del aglutinante de CD28(SA), y la unión a CD28(SA) monovalente en constructos biespecíficos anula la activación de linfocitos T superagonistas.

FAP-CD28 soporta la inactivación de células diana mediada por TCB y requiere la monovalencia del aglutinante de CD28 para sostener la dependencia de la diana tumoral

Se informa que la señalización de CD28 mejora las respuestas de linfocitos T mediadas por el receptor de linfocitos T. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB) son un componente de combinación prometedor para el agonismo de CD28. A través de la combinación de agonismo de CD28 dirigido con TCB, se prevé aumentar las funciones efectoras mediadas por TCB, disminuir el umbral de expresión de CEA para una activación de linfocitos T mediada por TCB eficaz, proporcionar signos de supervivencia y soportar la resistencia contra la supresión de linfocitos T por medio de PD-1 y CTLA4.

A fin de investigar si los agonistas de CD28 dirigidos pueden aumentar TCB, se evaluó la capacidad de FAP-CD28(SA) 1+2 (*P1AD9011*) y FAP-CD28(SA) 1+1 (*P1AD4492*) para soportar la inactivación de células diana mediada por TCB. El cocultivo de linfocitos T derivados de PBMC con células MV3 que coexpresaban MCSP y FAP durante 5 días en presencia de concentraciones en aumento de FAP-CD28 y concentraciones limitantes fijas de MCSP-TCB (5 pM) produjo un aumento en la inactivación de células diana MV3 de una manera dependiente de la concentración de FAP-CD28 (**figura 11A**). No obstante, la presencia de TCB eliminó la dependencia de FAP de FAP-CD28 en el formato bivalente CD28 (*P1AD9011*), mientras que la dependencia de FAP se mantuvo en el formato monovalente CD8 (*P1AD4492*), como se demostró mediante un aumento dependiente de la concentración en la inactivación de células diana mediada por CEACAM5-TCB en presencia de células tumorales MKN45 negativas para FAP que expresaban CEA 5 días después de la estimulación (**figura 11B**).

En un método alternativo, se evaluó la proliferación de linfocitos T inducida por FAP-CD28 1+2 SA (*P1AD9011)* en presencia o ausencia de TCB y en presencia o ausencia de FAP, respectivamente. Como se muestra en la **figura 12A** y en el ejemplo anterior, FAP-CD28(SA) 2+1 depende estrictamente de la presencia de FAP para la activación de linfocitos T en ausencia de TCB. No obstante, en presencia de TCB, como se muestra en la **figura 12B**, FAP-CD28(SA) 1+2 induce el aumento de la activación de linfocitos T incluso en ausencia de FAP.

Se especuló que la señal de TCR inducida por TCB potencialmente producía un preagrupamiento suficiente de componentes de señalización de TCR y, de este modo, tornaba la reticulación superficial de receptores CD28 en linfocitos T por medio de

moléculas CD28 bivalentes suficientes para desencadenar la coestimulación. Se concluyó que para métodos de combinación de TCB, la monovalencia del aglutinante de CD28 era estrictamente necesaria para mantener la dependencia de la diana tumoral de la molécula agonista de unión al antígeno CD28 dirigida.

La comparación de diversos formatos FAP-CD28 monovalentes revela un conjunto de diversos formatos FAP-CD28 funcionales, en donde los formatos 1+1 clásicos presentan la mayor potencia

A fin de evaluar el impacto del formato de anticuerpo específico de FAP-CD28 en cuanto a su capacidad para aumentar la activación de linfocitos T mediada por TCB, se generaron diferentes formatos de moléculas de unión al antígeno FAP-CD28 con unión a CD28 monovalente y se ilustran en las **figuras 1C, 1K, 1L** y **1M**. FAP-CD28 1+2 con bivalencia de CD28 se usó como referencia. A fin de evaluar la funcionalidad de estos formatos, los linfocitos T de PBMC se incubaron con células MV3 que coexpresaban MCSP y FAP durante 5 días en presencia de concentraciones en aumento de formatos FAP-CD28 junto con concentración limitante fija de MCSP-TCB (5 pM). Todos los formatos pudieron aumentar de manera significativa la proliferación de linfocitos T CD8 (**figura 13A**), la proliferación de linfocitos T CD4 (**figura 13B**) y la inactivación de células diana (**figura 13C**). Cabe destacar que la potencia de la molécula C (P1AD4492) fue mayor y comparable con la potencia del formato de referencia CD28 bivalente 1+2 SA (P1AD9011). La unión a CD28 y FAP de todas las moléculas se muestra en las **figuras 2F** y **2G,** respectivamente.

Ejemplo 8

Evaluación *in vitro* de la inactivación de células tumorales de la combinación de moléculas CD28 que actúan sobre el tumor y TCB que actúan sobre CEA

Preparación de anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB)

Las moléculas de TCB se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en WO 2014/131712 A1 o WO 2016/079076 A1. La preparación del anticuerpo biespecífico anti-CEA/anti-CD3 (CEA CD3 TCB o CEA TCB) usada en los experimentos se describe en el ejemplo 3 de WO 2014/131712 A1. CEA CD3 TCB es un anticuerpo “2+1 IgG CrossFab” y comprende dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas livianas diferentes. Las mutaciones puntuales en el dominio CH3 (“botones en ojales”) se introdujeron para promover el ensamblaje de las dos cadenas pesadas diferentes. El intercambio de los

dominios VH y VL en el Fab de unión a CD3 se realizó a fin de promover el correcto ensamblaje de las dos cadenas livianas diferentes. 2 +1 se refiere a que la molécula tiene dos dominios de unión al antígeno específicos para CEA y un dominio de unión al antígeno específico para CD3. CEACAM5 CD3 TCB tiene el mismo formato, pero comprende otro aglutinante de CEA y comprende mutaciones puntuales en los dominios CH y CL del aglutinante de CD3 a fin de soportar el correcto apareamiento de las cadenas livianas. CEA CD3 TCB comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163 y SEQ ID NO:164. CEACAM5 CD TCB comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:167 y SEQ ID NO:168.

CEA-CD28 actúa de manera sinérgica con CEACAM5-TCB en la inactivación de células diana

En un método alternativo, se generó una molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28(SA) 1+1 (molécula M, P1AE3127) y se evaluó su capacidad para aumentar la inactivación de células diana mediada por CEACAM5-TCB. Con este fin, células de cáncer colorrectal MKN45 que expresaban CEA se cocultivaron con linfocitos T de PBMC y CEA-CD28 (molécula M, P1AE3127) o CD28 monovalente no diana (Molécula L, P1AD8944) en presencia o ausencia de CEACAM5-TCB subóptimo (10 nM), y la inactivación de células MKN45 se evaluó en el tiempo. Como se muestra en la **figura 14**, solo la combinación de CEACAM5-TCB y CEA-CD28 produjo la inactivación de células diana, mientras que los compuestos solos no lograron la inactivación de células diana, lo que indicó efectos sinérgicos. Además, CD28 no diana en combinación con CEACAM5-TCB tampoco indujo la inactivación, lo que resalta nuevamente la necesidad de agonistas de CD28 monovalentes para la reticulación y, por lo tanto, la dependencia sostenida de la diana tumoral.

CEA-CD28 aumenta CEA-TCB y CEACAM5-TCB y disminuye umbrales de expresión de CEA en células cancerosas para que los TCB activen los linfocitos T

CEA-TCB y CEACAM5-TCB requieren un determinado nivel de expresión de CEA en las células diana para la activación de linfocitos T y la inactivación de células diana. Se evaluó si CEA-CD28 podía disminuir el umbral de expresión de CEA para que los TCB indujeran una inactivación de células diana eficaz. Con este fin, se incubaron linfocitos T de PBMC con concentraciones en aumento de CEA-TCB (P1AD4646) o CEACAM5-TCB (P1AD5299) y concentraciones fijas de CEA-CD28 (molécula M, P1AE3127) en presencia

de líneas de células diana con diferentes niveles de expresión de CEA: (i) MKN45 (expresión alta, aproximadamente 400.000 sitios de unión CEA/célula), (ii) Lovo (expresión media, aproximadamente 60.000 sitios de unión CEA/célula), (iii) HT-29 (expresión baja, aproximadamente 6.000 sitios de unión CEA/célula). La proliferación de linfocitos T se midió como representante de la activación de linfocitos T. Como se muestra en la **figura 15**, CEA-CD28 podía aumentar de manera significativa la potencia de CEA-TCB y CEACAM5-TCB. De manera más sorprendente, mientras que los TCB no lograron la activación de linfocitos T en células HT-29 con baja expresión de CEA solas, la adición de CEA-CD28 aumentó en gran medida la actividad de TCB. Se concluyó que CEA-CD2 aumenta CEA-TCB y CEACAM5-TCB y disminuye umbrales de expresión de CEA en células cancerosas para que los TCB activen los linfocitos T.

Ejemplo 9

Caracterización funcional *in vitro* de variantes de afinidad reducida de CD28(SA)

Para el aglutinante de CD28(SA) (TGN1412) original se determinó una afinidad de K_D=1 nM. Los aglutinantes de afinidad alta como este conllevan el riesgo de someterse a efectos de hundimiento periférico, en especial, si la diana está altamente expresada en sangre periférica, como es el caso de CD28. A fin de (i) reducir los efectos de hundimiento periférico, y (ii) reducir el riesgo de activación de linfocitos T periférica a través de la unión fuera de tumor de anticuerpos biespecíficos contra CD28 que actúan sobre el tumor a linfocitos T, se generó una serie de 31 aglutinantes de CD28 con afinidades reducidas al introducir mutaciones puntuales en las CDR (ver ejemplo 3). Las **figuras 4A, 4B** y **4C** muestran unión a CD28 en células CHO de las IgG monovalentes monoespecíficas para CD28 de sobrenadantes, lo que confirmó que la adición de mutaciones puntuales generaba un amplio rango de aglutinantes con diversas propiedades de unión. Con base en estos datos, una preselección de 11 candidatos se seleccionó para conversión en el formato biespecífico FAP-CD28 (ver ejemplo 4, tabla 6) para caracterización adicional. Los ensayos de unión confirmaron la unión positiva a FAP en células **(figuras 4F** y **4G**) así como la unión positiva y variada a CD28 de las variantes seleccionadas (**figuras 4D** y **4E**).

Las variantes de aglutinante de CD28 de afinidad reducida son funcionales *in vitro* en un formato biespecífico FAP-CD28

A fin de evaluar si las variantes de aglutinante de CD28 de afinidad reducida aún eran funcionales y capaces de soportar funciones efectoras mediadas por TCB, se evaluó la

proliferación de linfocitos T en combinación de TCB. Con este fin, los linfocitos T de PBMC se cocultivaron con células MV3 que coexpresaban MCSP y FAP durante 5 días en presencia de concentraciones en aumento de FAP-CD28 y concentración limitante fija de MCSP-TCB (5 pM). Como se ilustra en la **figura 4H**, todas las variantes de los aglutinantes de CD28 eran funcionales y capaces de aumentar la proliferación de linfocitos T mediada por TCB de una manera dependiente de la concentración. Cabe destacar que la variante de afinidad más baja 8 (P1AE3131) mostraba una reducción de aproximadamente 20 veces de afinidad en comparación con el clon de CD28 de origen pero recuperaba alrededor de 86 % de su potencia (**figura 4I**). En concordancia con estos descubrimientos, todas las variantes podían mejorar adicionalmente la inactivación de células diana mediada por TCB MV3 (**figura 4J**). Los correspondientes valores de EC_{50} se muestran en la **tabla 8** a continuación.

Tabla 8: Inactivación de células diana mediada por TCB MV3 por medio de moléculas biespecíficas FAP-CD28 de células diana MV3

Variante de FAP-CD28	TAPIR	EC_{50} de inactivación (nM)
De origen	P1AD4492	0,98
variante 8	P1AE3131	2,33
variante 11	P1AE3132	1,73
variante 12	P1AE3133	0,98
variante 15	P1AE3134	1,79
variante 29	P1AE3141	1,11

Con base en estos resultados, las variantes 8 (afinidad más baja, 23 nM), 15 (afinidad intermedia: 7,1 nM) y 29 (puntos calientes eliminados, casi sin reducción de afinidad, K_D=1,1 nM) se seleccionaron para caracterización adicional *in vitro* y evaluación *in vivo*, se analizaron según su eficacia y biodistribución mejorada en el tumor.

Las variantes de aglutinante de CD28 de afinidad reducida son funcionales *in vitro* en un formato biespecífico CEA-CD28

En un método alternativo, las tres variantes seleccionadas 8, 15 y 29 se convirtieron en un formato biespecífico que actúa sobre CEA y se evaluó su capacidad para mejorar la

activación de linfocitos T mediada por CEACAM5-TCB y la inactivación de células diana. La unión a CD28 de estas moléculas se muestra en la **figura 16**. A fin de evaluar la funcionalidad, los linfocitos T de PBMC se incubaron con concentraciones en aumento de CEACAM5-TCB y concentraciones fijas de variantes CEA-CD28 en presencia de células diana MKN45 que expresaban CEA. Como se ilustra e las **figuras 17A, 17B y 17C**, todas las variantes fueron capaces de mejorar la proliferación de linfocitos T mediada por TCB CD8 después de 5 días (**figura 17A**), la proliferación de linfocitos T CD4 después de 5 días (**figura 17B**) y la inactivación de células diana a las 90 h (**figura 17C**). Los correspondientes valores de EC_{50} se resumen en la **tabla 9** a continuación.

Tabla 9: Valores de EC_{50} de proliferación de linfocitos T CD8 y CD4 mediada por TCB e inactivación de células diana por medio de variantes biespecíficas CEA-CD28

Anticuerpo contra CEA-CD28	**EC_{50} de proliferación de CD4[nM]**	**EC_{50} de proliferación de CD8[nM]**	**EC_{50} de inactivación [nM]**
CD28 de origen	0,0013	0,0015	0,002
Variante 8	0,0035	0,0033	0,004
Variante 15	0,0021	0,0016	0,005
Variante 29	0,0013	0,0013	0,004
TCB solo	**0,046**	**0,038**	**0,012**

Ejemplo 10

Generación y producción de anticuerpos anti-CEA novedosos

10.1 Generación de variantes humanizadas de anticuerpo anti-CEA A5B7

10.1.1 Metodología

El anticuerpo anti-CEA A5B7 se divulga, por ejemplo, en M. J. Banfield *et al*, Proteins 1997, 29(2), 161-171 y su estructura puede hallarse como PDB ID:1CLO en la base de datos de estructuras de proteínas PDB (www.rcsb.org, H.M. Berman *et al*, The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 235-242). Esta entrada incluye la secuencia de dominio variable de la cadena pesada y liviana. Para la identificación de una estructura aceptora humana adecuada durante la humanización del aglutinante anti-

CEA A5B7, se usó un método clásico: buscar una estructura aceptora con homología de secuencia alta, injertar las CDR en esta estructura y evaluar cuáles retromutaciones podían contemplarse. Más explícitamente, cada diferencia de aminoácidos de las estructuras identificadas con respecto al anticuerpo de origen se analizó para determinar el impacto sobre la integridad estructural del aglutinante, y se introdujeron retromutaciones hacia la secuencia de origen, siempre que fuera adecuado. La evaluación estructural se basó en modelos de homología de la región Fv del anticuerpo de origen y sus versiones humanizadas creadas con una herramienta de modelado de homología de estructura de anticuerpos interna, implementada usando Biovia Discovery Studio Environment, versión 4.5.

10.1.2 Selección de estructura aceptora y sus adaptaciones

La estructura aceptora se seleccionó como se describe en la **tabla 10** a continuación:

Tabla 10: Estructura aceptora

	Murino más cercano Línea germinal de región V	Selección de línea germinal de región V aceptora humana
A5B7 VH	mu-IGHV7-3-02	IGHV3-23-01 o IGHV3-15-01
A5B7 VL	mu-IGKV4-72-01	IGKV3-11-01

Las regiones estructurales post-CDR3 se adaptaron de la línea germinal de elemento J humana IGJH6 para la cadena pesada, y una secuencia similar al elemento J kappa IGKJ2 para la cadena liviana.

Con base en consideraciones estructurales, las retromutaciones de la estructura aceptora humana con respecto al aminoácido en el aglutinante de origen se introdujeron en las posiciones 93 y 94 de la cadena pesada.

10.1.3 Regiones VH y VL de los anticuerpos contra CEA humanizados resultantes

Los dominios VH resultantes de los anticuerpos contra CEA humanizados se pueden hallar en la **tabla 11** a continuación, y los dominios VL resultantes de los anticuerpos contra CEA humanizados se enumeran en la **tabla 12** a continuación.

Tabla 11: Secuencias de aminoácidos de los dominios VH de anticuerpos contra CEA humanizados, con base en la estructura aceptora humana IGHV3-23 o IGHV3-15

Descripción	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
A5B7 VH secuencia de donante murino	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMNW VRQPPGKALEWLGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSQSILYLQMNTL RAEDSATYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTLTVSS	178
IGHV3-23-02 secuencia aceptora humana	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSW VRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK	218
Variantes humanizadas		
3-23A5-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	220
3-23A5-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	221
3-23A5-3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWVGF IGNKGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDR GLRFYFDYWGQGTTVTVSS	222
3-23A5-4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSW VRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR	223

	DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	
3-23A5-1A (todas_retromutaciones)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	224
3-23A5-1C (A93T)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	225
3-23A5-1D (K73)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	226
3-23A5-1E (G54A)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGF IGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	186
IGHV3-15*01 secuencia aceptora humana	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGR IKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT	219
Variantes humanizadas		
3-15A5-1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	227

3-15A5-2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWVGF IGNKANGYTTEYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	228
3-15A5-3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWVGF IGNKANGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCTR DRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS	229

Para la cadena pesada, la variante inicial 3-23A5-1 se determinó como adecuada en ensayos de unión (aunque mostró una unión levemente menor que el anticuerpo murino de origen) y se seleccionó como punto de inicio para modificaciones adicionales. Las variantes con base en IGHV3-15 mostraron menos actividad de unión en comparación con la variante humanizada 3-23A5-1.

A fin de restaurar la actividad de unión completa del anticuerpo quimérico de origen, se crearon las variantes 3-23A5-1A, 3-23A5-1C y 3-23A5-1D. También se evaluó la variante 3-23A5-1 para determinar si la longitud de CDR-H2 podía adaptarse a la secuencia aceptora humana, pero este constructo perdió por completo la actividad de unión. Dado que un punto caliente de desamidación putativa estaba presente en CDR-H2 (Asn53-Gly54), se cambió ese motivo por Asn53-Ala54. Otro punto caliente posible Asn73-Ser74 se retromutó por Lys73-Ser74. Por ende, se creó la variante 3-23A5-1E.

Tabla 12: Secuencias de aminoácidos de los dominios VL de anticuerpos contra CEA humanizados, con base en la estructura aceptora humana IGKV3-11.

Descripción	**Secuencia**	**SEQ ID NO**
A5B7 VL secuencia de donante murino	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYAT SNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQHWSSKPPTFGGG TKLEIK	179
IGKV3-11 secuencia aceptora humana	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWP	230
variantes humanizadas		
A5-L1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRLLIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	231
A5-L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYIHWYQQKPGQAPRLLIYA TSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQ GTKLEIK	232
A5-L3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRLLIYDA SNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	233
A5-L4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRLLIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSKPPTFGQG	234

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
	TKLEIK	
A5-L1A (todas_retromutaciones)	QTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	235
A5-L1B (Q1T2)	QTVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRLLIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	236
A5-L1C (FR2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGSSPKSWIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	237
A5-L1D (46,47)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYAT SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQG TKLEIK	187

La cadena liviana se humanizó con base en la estructura aceptora IGKV3-11 humana. En la serie A5-L1 a A5-L4, se pudo observar que la variante A5-L1 presentaba buena actividad de unión (aunque levemente menor que el anticuerpo de origen). La humanización parcial de CDR-L1 (variante A5-L2; posiciones de Kabat 30 y 31) anulaba por completo la unión. Asimismo, la humanización de CDR-H2 (variante A5-L3; posiciones de Kabat 50 a 56) también anulaba por completo la unión. La posición 90 (variante A5-L4) mostraba una contribución significativa a las propiedades de unión. La Histidina en esta posición resulta importante para la unión. Por ende, la variante A5-L1 se seleccionó para modificación adicional.

La serie A5-L1A a A5-L1D resolvió la cuestión sobre las retromutaciones necesarias para restaurar el potencial de unión completa del anticuerpo quimérico de origen. La variante A5-L1A mostró que la retromutaciones en las posiciones de Kabat 1, 2, la estructura completa 2, y la posición de Kabat 71 no agregaban actividad de unión adicional. Las variantes A5-L1B y A5-L1C abarcaban subconjuntos de esas posiciones y confirmaron que no alteraban las propiedades de unión. La variante A5-L1D con retromutaciones en las posiciones de Kabat 46 y 47 mostró la mejor actividad de unión.

10.1.4 Selección de anticuerpos contra A5B7 humanizados

Con base en las nuevas variantes de humanización de VH y VL, nuevos anticuerpos contra CEA se expresaron como anticuerpos huIgG1 con un Fc silencioso efector (P329G; L234, L235A) para anular la unión a receptores Fcγ de acuerdo con el método descrito en WO 2012/130831 A1, y su unión a CEA expresada en células MKN45 se evaluó y se comparó con el respectivo anticuerpo A5B7 murino de origen.

Tabla 13: Combinaciones de VH/VL expresadas como anticuerpos huIgG1_LALA_PG

	A5-L1A	A5-L1B	A5-L1C	A5-L1D
3-23A5-1A	P1AE2164	P1AE2165	P1AE2166	P1AE2167
3-23A5-1C	-	-	P1AE2176	P1AE2177
3-23A5-1D	P1AE2179	-	P1AE2181	P1AE2182

MKN45 (DSMZ ACC 409) es una línea de células de adenocarcinoma gástrico humano que expresa CEA. Las células se cultivaron en RPMI avanzado + 2 % de FCS + 1 % de Glutamax. La viabilidad de las células MKN-45 se controló, y las células se volvieron a suspender y se ajustaron a una densidad de 1 célula Mio/ml. 100 µl de esta suspensión celular (que contenía 0,1 células Mio) se sembraron en una placa de 96 cavidades de fondo redondo. La placa se centrifugó durante 4 min a 400 xg, y el sobrenadante se retiró. Luego, 40 µl de los anticuerpos diluidos o amortiguador FACS se agregaron a las células y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Luego de la incubación, las células se lavaron dos veces con 150 µl de amortiguador FACS por cavidad. Luego, 20 µl del anticuerpo secundario específico anti-Fc humano con PE secundario diluido (109-116-170, Jackson ImmunoResearch) se agregaron a las células. Las células se incubaron durante 30 min más a 4 °C. A fin de retirar el anticuerpo sin unir, las células se volvieron a lavar dos

veces con 150 µl por cavidad de amortiguador FACS. Para fijar las células, 100 µl de amortiguador FACS que contenía 1 % de PFA se agregaron a las cavidades. Antes de la medición, las células se volvieron a suspender en 150 µl de amortiguador FACS. La fluorescencia se midió usando un citómetro de flujo BD.

En la **figura 18** se muestran las curvas de unión de las variantes de A5B7 humanizadas. Todos los aglutinantes evaluados fueron capaces de unirse a células MKN45, pero la capacidad de unión se redujo levemente en comparación con el anticuerpo A5B7 de origen. El clon P1AE2167 presentó la mejor unión de todas las variantes evaluadas, y se seleccionó para desarrollo adicional.

10.1.5 Determinación de afinidades de fragmentos Fab de variantes humanizadas de anticuerpo contra CEA murino A5B7 con respecto a CEA humano usando resonancia de plasmones superficiales (BIACORE)

Las afinidades de fragmentos Fab de las variantes humanizadas del anticuerpo contra CEA murino A5B7 con respecto a CEA humano se evaluaron mediante resonancia de plasmones superficiales usando un instrumento BIACORE T200. En un chip CM5, CEA humano (hu N(A2-B2)A-avi-His B) se inmovilizó a una concentración de 40 nM mediante acoplamiento de aminas estándar en la célula de flujo 2 durante 30 s a alrededor de 100 RU. Los fragmentos Fab de las variantes humanizadas del anticuerpo contra CEA murino A5B7 se inyectaron posteriormente como analitos en diluciones de 3 veces que variaban de 500 - 0,656 nM durante un tiempo de contacto de 120 s, un tiempo de disociación de 250 o 1000 s y a una velocidad de flujo de 30 µl/min. La regeneración en el nivel de CEA humano (hu N(A2-B2)A-avi-His B) se logró mediante 2 pulsos de 10 mM de glicina/HCl pH 2,0 durante 60 s. Los datos se verificaron dos veces frente a la célula de flujo no inmovilizada 1 y una concentración cero del analito. Los sensogramas de los analitos se ajustaron a un modelo de interacción de Langmuir simple 1:1. Las constantes de afinidad [K_D] para CEA humano (dominio A2) se resumen en la tabla 14 a continuación.

Tabla 14: Constantes de afinidad de fragmentos Fab que representan diferentes variantes humanizadas de anticuerpo contra CEA murino A5B7 con respecto a CEA humano (dominio A2)

Tapir ID	Nombre	Afinidad por N(A2-B2)A-avi-His B humano [M]
P1AE0289	CEA (A5B7) Fab (anticuerpo murino de origen)	5,59 E-10
P1AE4135	Fab derivado de P1AE2164	1,70 E-09
P1AE4136	Fab derivado de P1AE2165	1,25 E-09
P1AE4137	Fab derivado de P1AE2166	1,13 E-08
P1AE4138	Fab derivado de P1AE2167	1,47 E-09
P1AE4139	Fab derivado de P1AE2176	7,58 E-09
P1AE4140	Fab derivado de P1AE2177	7,62 E-09
P1AE4141	Fab derivado de P1AE2179	1,83 E-09
P1AE4142	Fab derivado de P1AE2181	2,64 E-09
P1AE4143	Fab derivado de P1AE2182	2,92 E-09

Las variantes humanizadas del anticuerpo contra CEA murino A5B7 tenían afinidades más bajas que el anticuerpo murino de origen. El fragmento Fab P1AE4138, derivado de P1AE2167 (cadena pesada con variante VH 3-23A5-1A y cadena liviana Ckappa con variante VL A5-L1D) se seleccionó como variante humanizada final. Además, una mutación de glicina a alanina en la posición de Kabat 54 (G54A) se introdujo en el dominio VH a fin de retirar un sitio de desamidación, lo que produjo una variante VL 3-23A5-1E. El anticuerpo humanizado final (cadena pesada con variante VH 3-23A5-1E y cadena liviana Ckappa con variante VL A5-L1D) se denominó A5H1EL1D o huA5B7.

10.2 Generación de anticuerpos anti-CEA madurados por afinidad derivados de A5H1EL1D

10.2.1 Preparación, purificación y caracterización de antígenos para una campaña de expresión en fago

El anticuerpo murino A5B7 y su derivado humanizado A5H1EL1D se unieron al dominio A2 de CEACAM5 (CEA) con una afinidad de alrededor de 0,8 y alrededor de 2,5 nM,

respectivamente. Para la generación de variantes maduradas por afinidad de A5H1EL1D mediante expresión en fago, se generaron 3 antígenos solubles recombinantes diferentes. Cada proteína contenía una etiqueta avi de extremo C para biotinilación específica de sitio y una etiqueta his para purificación: La primera proteína consistía en la parte extracelular de CEACAM1 que consistía en los 4 dominios de tipo Ig N, A1, B, A2 (NABA-avi-His, SEQ ID NO: 238, tabla 15). La segunda proteína era una proteína quimérica que consistía en 2 dominios de Ig CEACAM5 y 2 dominios de Ig CEACAM1. Con base en la secuencia de los cuatro dominios de CEACAM1, el ADN que codificaba el segundo y tercer dominio de CEACAM1 (dominios A1 y B) se reemplazó por el ADN que codificaba los dominios A2 y B2 de CEACAM5 (N(A2B2)A-avi-His, SEQ ID NO:239, tabla 15). La tercera proteína era una proteína quimérica que consistía en 1 dominio de Ig CEACAM5 y 3 dominios de Ig CEACAM1. Con base en la secuencia de los cuatro dominios de CEACAM1, el ADN que codificaba el tercer dominio de CEACAM1 (dominio B) se reemplazó por el ADN que codificaba el dominio B2 de CEACAM5 (NA(B2)A-avi-His, SEQ ID NO:240, tabla 15). Una descripción esquemática de los tres constructos se muestra en las **figuras 19A, 19B** y **19C**.

Tabla 15: Secuencias de aminoácidos de los antígenos CEA usados

Antígeno	**Secuencia**	SEQ ID NO
NABA-avi-His	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGT QQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQF HVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAMAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPR LQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTI SPSDTYYRPGANLSLSCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNS GSYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNL TCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEV FNPISKNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVDLEVLFQGPGSGLNDIFEAQKIE	238

	WHEARAHHHHHH	
N(A2B2)A-avi-His	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGT QQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQF HVYPELPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPR LQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGPDDPTI SPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNS GLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSALSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNL TCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEV FNPISKNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVDGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHH HHHH	239
NA(B2)A-avi-His	QLTTESMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGT QQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQF HVYPELPKPSISSNNSNPVEDKDAMAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPR LQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDDPTI SPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNS GLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSALSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNL TCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNITLSINPVKREDAGTYWCEV FNPISKNQSDPIMLNVNYNALPQENLINVDGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHH HHHH	240

Los respectivos plásmidos se transfectaron de manera transitoria en células HEK 293, que expresaban de manera estable la proteína EBNA derivada de EBV (HEK EBNA). Un plásmido cotransfectado de manera simultánea que codificada la biotina ligasa BirA permitió la biotinilación específica para etiqueta avi *in vivo*. Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar usando cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) y luego filtración en gel. Las fracciones de proteína monomérica de agruparon, se concentraron (de ser necesario), se congelaron y se almacenaron a -80 °C. Parte de las muestras se proporcionaron para el posterior análisis de proteínas y la caracterización analítica, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o espectrometría de masas.

10.2.2 Selección de anticuerpos derivados de A5H1EL1D madurados por afinidad

La humanización del anticuerpo A5B7 produjo una reducción de 3 a 4 veces en la afinidad por CEA según se midió mediante SPR. Mientras que la afinidad para A5B7 era de alrededor de 0,8 nM, se midió una afinidad de alrededor de 2,5 nM para A5H1EL1D. Experimentos de FACS usando líneas celulares con diferentes niveles de expresión de CEA confirmaron este descubrimiento. A fin de mejorar la afinidad del clon humanizado A5H1EL1D, se crearon y se usaron 3 diferentes colecciones de maduración por afinidad para la selección de clones con afinidades mejoradas mediante expresión en fago.

10.2.2.1 Generación de colecciones de maduración por afinidad de A5H1EL1D

La generación de anticuerpos derivados de A5H1EL1D madurados por afinidad se realizó mediante expresión en fago usando protocolos estándar (Silacci *et al*, 2005). En una primera etapa, las secuencias de ADN que codificaban la VH y VL del clon de origen humanizado A5H1EL1D (secuencias de aminoácidos SEQ ID Nos: 186 y 187) se clonaron en un fagémido que se usó luego como una plantilla para aleatorización. En una etapa posterior, se generaron tres colecciones para la selección de clones favorables mediante expresión en fago. Las colecciones de maduración 1 y 2 se aleatorizaron en CDR1 y CDR2 de la cadena pesada o en CDR1 y CDR2 de la cadena liviana. La tercera colección de maduración se aleatorizó en la regiones CDR3 de las cadenas pesadas y livianas. Las posiciones aleatorizadas en las regiones CDR respectivas se muestran en las **figuras 20A** y **20B**. Para la generación de la colección de maduración 1, con aleatorización en CDR1 y 2 de la cadena pesada, dos fragmentos se ensamblaron mediante “empalme por extensión de solapamiento” (SOE) PCR y se clonaron en el vector de fago (**figura 21A**). Las siguientes combinaciones de cebador se usaron para

generar los fragmentos de la colección: fragmento 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 243, tabla 16) y A5H1EL1D_H1_rev_TN (SEQ ID NO: 241, tabla 16) y fragmento 2 (A5H1EL1D_H2_for_TN (SEQ ID NO: 242, tabla 7) y HCDR3-rev-constante (SEQ ID NO: 244, tabla 16).

Tabla 16: Cebadores para colección de maduración por afinidad A5H1EL1D H1 / H2

Nombre	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
A5H1EL1D _H1_rev_TN	CAG CCA CTC GAG GCC TTT ACC CGG TGC TTG GCG TAC CCA X17 CAT X16 X15 X14 X13 GAA X12 GAA GCC AGA AGC CGC GCA GCT GAG ACG X12: 60 % T; 5 % A/S/G/Y/N/D/E/Q X13: 50 % T; 20 % S; 4,3 % A/G/Y/N/D/E/Q X14: 50 % D; 20 % S; 4,3 % G/Y/T/N/A/E/Q X15: 60 % Y; 4 % G/V/H/S/E/Q/N/D/R/F X16: 50 % Y; 20 % A; 3,75 % G/V/T/H/L/I/R/F X17: 50 % N; 20 % S; 3 % D/E/Q/G/Y/V/T/H/A/L	241
A5H1EL1D _H2_for_TN	CGC CAA GCA CCG GGT AAA GGC CTC GAG TGG CTG GGT X18 ATC X19 X20 X21 X22 X23 GCG TAC ACC ACG GAA TAC TCC GCC TCC X18: 60 % F; 10 % A; 6 % Y/V/L/I/G X19: 50 % G; 20 % S; 3 % A/K/T/V/N/D/E/Q/L/I X20: 50 % N; 20 % G; 3,75 % D/E/Q/S/Y/T/H/A X21: 60 % K; 5 % A/T/Y/N/D/E/Q/R X22: 60 % A; 4 % V/G/D/P/H/N/E/Q/L/I X23: 60 % N; 5 % D/E/Q; 4,17 % G/T/H/S/A/R	242
LMB3 extenso	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT AC	243
HCDR3-rev-constante	AAC GGT CAC CGT GGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC GAA ATA GAA GCG CAG ACC AC	244

Para la generación de la colección de maduración 2, con aleatorización en CDR1 y 2 de la cadena liviana, dos fragmentos se ensamblaron mediante “empalme por extensión de

solapamiento" (SOE) PCR y se clonaron en el vector de fago (**figura 21B**). Las siguientes combinaciones de cebador se usaron para generar los fragmentos de la colección: fragmento 1 (LMB3 (SEQ ID NO: 243, tabla 17) y A5H1EL1D_L1_rev_TN (SEQ ID NO: 245, tabla 17) y fragmento 2 (A5H1EL1D_L2_for_TN (SEQ ID NO: 246, tabla 17) y HCDR3-rev-constante (SEQ ID NO: 244, tabla 17).

Tabla 17: Cebadores para colección de maduración por afinidad A5H1EL1D L1 / L2

Nombre	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
A5H1EL1D _L1_rev_TN	GGA ACG CGG GGC CTG GCC TGG TTT TTG CTG ATA CCA X06 X05 X04 X03 X02 X01 GCT GGA TGC GCG GCA AGA CAG GGT AGC ACG X01: 50 % S; 20 % V; 3,33 % T/A/G/N/D/E/Q/Y/H X02: 50 % V; 20 % S; 3,33 % T/A/G/N/Q/F/Y/P/H X03: 50 % T; 20 % S; 2,72 % A/G/Y/V/P/H/N/D/E/Q/R X04: 60 % Y; 4 % F/G/A/V/T/H/S/N/Q/R X05: 70 % I; 30 % L X06: 50 % H; 20 % A; 3,33 % R/K/G/S/T/Q/Y/N/V	245
A5H1EL1D _L2_for_TN	CAG CAA AAA CCA GGC CAG GCC CCG CGT TCC TGG ATC X07 X08 X09 X10 X11 CTC GCT TCT GGT ATC CCG GCA CGT TTC TCC GGC X07: 60 % Y; 10 % F; 7,5 % H/K/N/S X08: 50 % A; 20 % D; 3,33 % V/G/S/T/Y/H/N/E/Q X09: 50 % T; 20 % A; 3,33 % S/G/V/P/H/N/D/E/Q X10: 60 % S; 4 % T/A/G/N/D/E/Q/Y/V/H X11: 60 % N; 4 % D/E/Q/Y/K/T/H/S/A/R	246
LMB3 extenso	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT AC	243
HCDR3-rev-constante	AAC GGT CAC CGT GGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC GAA ATA GAA GCG CAG ACC AC	244

Para la generación de la colección de maduración 3, con aleatorización en CDR3 de las cadenas livianas y pesadas, dos fragmentos se ensamblaron mediante "empalme por

extensión de solapamiento" (SOE) PCR y se clonaron en el vector de fago (**figura 21C**). Las siguientes combinaciones de cebador se usaron para generar los fragmentos de la colección: fragmento 1 (LMB3 (SEQ ID NO:243, tabla 18) y LCDR3-rev-constante (SEQ ID NO:249, tabla 18) y fragmento 2 (A5H1EL1D_L3_for_TN (SEQ ID NO: 247, tabla 18) y A5H1EL1D_H3_rev_TN (SEQ ID NO: 248, tabla 18).

Tabla 18: Cebadores para colección de maduración por afinidad A5H1EL1D L3 / H3

Nombre	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**
A5H1EL1D _L3_for_TN	GAG CCT GAA GAT TTT GCC GTA TAC TAT TGT X24 X25 X26 X27 X28 X29 X30 X31 ACT TTC GGT CAG GGC ACC AAG CTG GAA ATC X24: 90 % Q; 10 % H X25: 60 % H; 5 % R/K/Q/E/Y/F/N/D X26: 65 % W; 7 % F/Y/V/L/I X27: 58 % S; 4 % T/A/G/N/D/E/Q; 2 % Y/V/P/H/L/I/R X28: 58 % S; 4 % T/A/G/N/D/E/Q; 2 % Y/V/P/H/L/I/R X29: 60 % K; 5 % R/H; 2,72 % A/V/T/P/Y/N/D/E/Q/L/I X30: 70 % P; 5 % A/S/T/R/S/L X31: 60 % P; 5 % L/G/R/M; 2,86 % A/V/L/I/F/S/R	247
A5H1EL1D _H3_rev_TN	AAC GGT CAC CGT GGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC X40 X39 X38 X37 X36 X35 X34 X33 X32 AGT ACA GTA GGT GGC GGT GTC TTC TGC X32: 60 % R; 10 % K; 2,72 % A/V/T/P/Y/N/D/E/Q/L/H X33: 60 % D; 5 % N/E/Q; 2,5 % G/Y/V/T/H/S/A/L/I/R X34: 60 % R; 5 % K/H; 2,72 % A/V/T/P/Y/N/D/E/Q/L/I X35: 60 % G; 5 % A/S/T; 2,5 % Y/V/P/H/N/D/E/Q/L/I X36: 60 % L; 4 % I/V/A/F; 2,4 % G/Y/T/P/H/S/N/D/E/Q X37: 60 % R; 5 % K/H; 2,72 % A/V/T/P/Y/N/D/E/Q/L/I X38: 65 % F; 5 % Y/W/A/V/L/I/G X39: 60 % Y; 5 % F/W; 2,14 % G/A/V/T/P/H/S/N/D/E/Q/L/I/R	248

	X40: 80 % F; 10 % I/L	
LCDR3-rev-constante	ACA ATA GTA TAC GGC AAA ATC TTC AGG CTC	249
LMB3 extenso	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT AC	243
Amplificación de HCDR3	AGA AAC GGT CAC CGT GGT ACC CTG GCC CCA GTA GTC	250

Para el ensamblaje de los fragmentos de cada colección, se usaron cantidades equimolares de cada fragmento y se amplificaron con los respectivos cebadores externos. Para el ensamblaje de los fragmentos de la tercera colección, con aleatorización en HCDR3 y LCDR3, se usó el cebador LMB3 (SEQ ID NO:243, tabla 18) en combinación con el cebador “amplificación de HCDR3 ” (SEQ ID NO:250, tabla 18). Este cebador se usó a fin de extender el extremo terminal C de VH con la secuencia que contenía un sitio KpnI. Luego del ensamblaje de cantidades suficientes de fragmentos aleatorizados de longitud completa para todas las colecciones, se digirieron con NcoI/KpnI junto con un vector fagémido aceptor tratado de igual manera. Un exceso molar de 3 veces de inserto de colección se ligó con 20 μg de vector fagémido. Se usaron ligaduras purificadas para 20 transformaciones, lo que produjo alrededor de 0,7 x 10^9 a 2 x 10^9 transformantes. Las partículas de fagémido que presentaban las colecciones de maduración por afinidad A5H1EL1D se rescataron y purificaron mediante purificación PEG/NaCl a fin de usarse para las selecciones.

10.2.2.2 Selección de clones derivados de A5H1EL1D madurados por afinidad

Para la selección de clones madurados por afinidad, la selección de expresión en fago con las 3 colecciones se realizó usando antígenos solubles recombinantes. Las rondas de cribado se realizaron en solución de acuerdo con el siguiente patrón: 1. Depuración previa de partículas de fagémido no específicas mediante incubación con 200 nM de NA(B2)A-avi-His biotinilada y NABA-avi-his durante 0,5 h, 2. Captura de NA(B2)A-avi-His biotinilada, NABA-avi-his, y partículas de fagémido unidas mediante la adición de 5,4 x 10^7 microesferas magnéticas cubiertas de estreptavidina durante 10 min, 3. Aislamiento de partículas de fagémido no unidas de sobrenadante para selección adicional, 4. Unión de partículas de fagémido a 20 nM de N(A2B2)A-avi-His biotinilada durante 0,5 h en un volumen total de 1 ml, 5. Captura de proteína N(A2B2)A-avi-His biotinilada y partículas de fago específicamente unidas mediante la adición de 5,4 x 10^7 microesferas magnéticas

cubiertas de estreptavidina durante 10 min, 6. Lavado de las microesferas usando 5 x 1 ml de PBS/Tween20 y 5 x 1 ml de PBS, 7. Elución de partículas de fago mediante la adición de 1 ml de 100 mM de TEA durante 10 min y neutralización mediante la adición de 500 µl de 1 M Tris/HCl pH 7,4, 8. Infección de bacteria *E. coli* TG1 que crece exponencialmente, 9. Infección con fago coadyuvante VCSM13 y 10. Posterior precipitación con PEG/NaCl de partículas de fagémido para su uso en rondas de selección posteriores. Las selecciones se realizaron durante 3 rondas usando concentraciones de antígeno decrecientes (20 x 10^{-9} M, 10 x 10^{-9} M y 2 x 10^{-9} M). En la ronda 3, las microesferas de estreptavidina se lavaron con 20 x 1 ml de PBS/Tween20 y 5 x 1 ml de PBS.

Los aglutinantes específicos se identificaron mediante ELISA como se muestra a continuación: 100 µl de 10 nM de proteína N(A2B2)A-avi-His biotinilada o 40 nM de proteína NA(B2)A-avi-His biotinilada por cavidad se cubrieron en placas de neutravidina. Los sobrenadantes bacterianos que contenían Fab se agregaron y los Fab de unión se detectaron mediante sus etiquetas Flag usando un anticuerpo secundario anti-Flag/HRP. Los clones que eran positivos para ELISA en proteína N(A2B2)A-avi-His recombinante pero no en proteína NA(B2)A-avi-His se evaluaron adicionalmente mediante SPR.

10.2.2.3 Identificación de variantes derivadas de A5H1EL1D maduradas por afinidad mediante SPR

A fin de caracterizar adicionalmente los clones positivos para ELISA, la velocidad de disociación se midió mediante resonancia de plasmones superficiales usando una máquina Proteon XPR36 y los resultados se compararon con el clon humanizado de origen A5H1EL1D.

Para este experimento, alrededor de 2000, 1000 y 500 RU de N(A2B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en 3 canales usando un chip NLC cubierto con estreptavidina en orientación vertical. Como un control para unión no específica, 2000 RU de proteína NA(B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en el canal 4. Para el análisis de velocidad de disociación de los clones positivos para ELISA identificados, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal. Antes de la inyección, cada sobrenadante bacteriano que contenía Fab se filtró y se diluyó 3 veces con PBS. El tiempo de asociación fue 100 s a 100 µl/minuto, y los tiempos de disociación fueron 600 o 1200 s. El sobrenadante bacteriano sin fragmento Fab se usó para referencia. La regeneración se realizó con 10 mM de glicina pH 1,5 durante 35 s a 50 µl/min (orientación vertical).

Las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas. Los clones que expresaban Fab con las constantes de velocidad de disociación más lentas se identificaron y se preseleccionaron. Los clones preseleccionados se volvieron a evaluar en un experimento SPR adicional en las mismas condiciones. Esta vez, durante cada inyección, 4 clones madurados por afinidad se compararon directamente en paralelo con el clon de origen A5H1EL1D. El sobrenadante bacteriano sin fragmento Fab se usó para referencia. Los clones que mostraron una velocidad de disociación más lenta que A5H1EL1D en N(A2B2)A-avi-His y unión nula a NA(B2)A-avi-His se seleccionaron y los dominios variables de los correspondientes fagémidos se secuenciaron. Las velocidades de disociación medidas de los mejores clones se muestran en la **tabla 19** y las secuencias de los respectivos dominios variables se enumeran en la **tabla 20**.

Tabla 19: Constantes de disociación cinética (koff) de clones seleccionados que se obtuvieron en análisis de cribado con sobrenadante bacteriano

Clon	Constante de disociación kd (1/s)
A5H1EL1D	3,10E-04
P006.038	7,41E-05
P005.097	8,87E-05
P005.103	5,37E-05
P002.139	6,47E-05
P001.177	9,81E-05
P005.102	4,24E-05

Tabla 20: Secuencias de aminoácidos del clon de origen A5H1EL1D y clones seleccionados madurados por afinidad

Clon	Cadena	SEQ ID NO	Secuencia
A5H1EL1D	VL	187	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
	VH	186	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDY WGQGTTVTVSS
P006.038	VL	195	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
	VH	194	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDY WGQGTTVTVSS
P005.097	VL	197	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSQPPTFGQGTKLEIK
	VH	196	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFSFDY WGQGTTVTVSS
P005.103	VL	199	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
	VH	198	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFYFDY WGQGTTVTVSS
P002.139	VL	201	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
	VH	200	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNW VRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDY WGQGTTVTVSS
P001.1	VL	203	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS

77			LEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
	VH	202	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDY WGQGTTVTVSS
P005.102	VL	205	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
	VH	204	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDY WGQGTTVTVSS
P005.102-combo1	VL	207	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
	VH	206	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDY WGQGTTVTVSS
P005.102-combo2	VL	209	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIK
	VH	208	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFSDYYMNW VRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDY WGQGTTVTVSS
P005.103-combo1	VL	211	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
	VH	210	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDY WGQGTTVTVSS
P005.103-combo2	VL	213	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIK
	VH	212	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNW VRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDY WGQGTTVTVSS
P006.038-	VL	215	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS

combo 1			LEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
	VH	214	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNW VRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDY WGQGTTVTVSS
P006.038-combo 2	VL	217	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQK PGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIK
	VH	216	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMNW VRQAPGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTIS RDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDY WGQGTTVTVSS

10.2.2.4 Purificación Fab de clones A5H1EL1D madurados por afinidad

A fin de caracterizar adicionalmente los clones madurados por afinidad, los respectivos fragmentos Fab se purificaron para el análisis exacto de los parámetros cinéticos. Para cada clon, un cultivo de 500 ml se inoculó con bacterias que comprendían el correspondiente fagémido, y se indujo con 1 mM de IPTG a una densidad óptica medida a 600 nm (OD600) de 0,9. Luego, los cultivos se incubaron a 25 °C durante la noche y se recolectaron mediante centrifugación. Luego de la incubación del pelet resuspendido durante 20 min en 25 ml de amortiguador PPB (30 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM de EDTA, 20 % de sacarosa), las bacterias se volvieron a centrifugar y el sobrenadante se recolectó. Esta etapa de incubación se repitió una vez con 25 ml de una solución de MgSO4 5 mM. Los sobrenadantes de ambas etapas de incubación se agruparon, se filtraron y se cargaron en una columna IMAC (His gravitrap, GE Healthcare). Posteriormente, la columna se lavó con 40 ml de amortiguador de lavado (500 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, 20 mM de NaH_2PO_4 pH 7,4). Luego de la elución (500 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, 20 mM de NaH_2PO_4 pH 7,4) el eluato se volvió a amortiguar usando columnas PD10 (GE Healthcare). El rendimiento de la proteína purificada estaba en el rango de 300 a 500 μg/l.

10.2.2.5 Análisis SPR de fragmentos Fab A5H1EL1D madurados por afinidad purificados

La afinidad (KD) de los fragmentos Fab purificados se midió mediante resonancia de plasmones superficiales usando una máquina Proteon XPR36 usando la misma configuración que se describió anteriormente.

Alrededor de 2000, 1000, 500 y 250 RU de N(A2B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en 4 canales de un chip NLC cubierto con estreptavidina en orientación vertical. Como un control para unión no específica, 2000 RU de proteína NA(B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en el canal 5. Para la determinación de la afinidad (KD) de los clones purificados, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal. Series de dilución de dos veces de fragmentos Fab purificados (rangos de concentración que variaban entre 100 y 3 nM) se inyectaron de manera simultánea a 100 µl/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 100 s y tiempos de disociación de 1200 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. La regeneración se realizó con 10 mM de glicina pH 1,5 durante 35 s a 50 µl/min (orientación vertical).

Las constantes de velocidad de asociación (kon) y las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibro (KD) se calculó como la relación koff/kon. Los datos cinéticos y termodinámicos se enumeran en la tabla 21.

Tabla 21: Determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos de fragmentos Fab purificados mediante SPR

Clon ID	k on (1/Ms)	k off (1/s)	K_D (nM)
A5H1EL1D	1,08E+5	2,48E-4	2,3
P006.038	2,25E+5	5,78E-5	0,25
P005.097	0,94E+5	8,54E-5	0,91
P005.103	1,00E+5	4,99E-5	0,5
P002.139	1,05E+5	6,53E-5	0,63
P001.177	2,67E+5	7,85E-4	0,29
P005.102	1,34E+5	3,92E-4	0,29

10.2.2.6 Combinación de posiciones CDR de clones madurados por afinidad

En un intento de aumentar adicionalmente la afinidad por CEA, las posiciones CDR de varios aglutinantes madurados por afinidad identificados previamente se combinaron entre sí. Esto incluyó no solo posiciones específicas dentro de una CDR sino también combinaciones de CDR de diferentes aglutinantes. Una alineación de todos los clones, clones combinatorios y derivados de expresión en fago, se muestra en las **figuras 22A** y **22B**. Las CDR de todas las cadenas pesadas y cadenas livianas se enumeran en la tabla 22 y 23, respectivamente. Los dominios VH y VL se resumen en la tabla 20.

Tabla 22: Secuencias de CDR de cadenas pesadas maduradas por afinidad

Clon	SEQ ID NO	CDR-H1	SEQ ID NO	CDR-H2	SEQ ID NO	CDR-H3
A5H1EL1D	180	GFTFTDYYMN	181	FIGNKANAYTTEYSASVKG	182	DRGLRFYFDY
P006.038	251	GFTFTDYYMN	252	FIGNKANAYTTEYSASVKG	253	DRG**I**RF**G**FDY
P005.097	257	GFTFTDYYMN	258	FIGNKANAYTTEYSASVKG	259	DRGLRF**S**FDY
P005.103	263	GFTFTDYYMN	264	FIGNKANAYTTEYSASVKG	265	DRG**I**RFYFDY
P002.139	269	GF**Y**FTDY**A**MN	270	**V**I**S**NKANAYTTEYSASVKG	271	DRGLRFYFDY
P001.177	275	GF**Y**FTDYYMN	276	FI**S**NKANAYTTEYSASVKG	277	DRGLRFYFDY
P005.102	281	GFTFTDYYMN	282	FIGNKANAYTTEYSASVKG	283	DRG**I**RF**Q**FDY
P005.102-combo1	287	GF**Y**FTDYYMN	288	**V**I**S**NKANAYTTEYSASVKG	289	DRG**I**RF**Q**FDY
P005.102-combo2	293	GF**Y**F**S**DYYMN	294	**V**I**S**NKANAYTTEYSASVKG	295	DRG**I**RF**Q**FDY
P005.103-combo1	299	GFTFTDYYMN	300	FIGNKANAYTTEYSASVKG	301	DRG**I**RF**S**FDY
P005.103-combo2	305	GF**Y**FTDYYMN	306	**V**I**S**NKANAYTTEYSASVKG	307	DRG**I**RF**S**FDY
P006.038-combo1	311	GF**Y**FTDY**A**MN	312	**V**I**S**NKANAYTTEYSASVKG	313	DRG**I**RF**G**FDY
P006.038-combo2	317	GFTF**S**DY**E**MN	318	FI**S**NKANAYTTEYSASVKG	319	DRG**I**RF**G**FDY

Tabla 23: Secuencias de CDR de cadenas livianas maduradas por afinidad

Clon	SEQ ID NO	CDR-L1	SEQ ID NO	CDR-L2	SEQ ID NO	CDR-L3
A5H1EL1D	183	RASSSVTYIH	184	ATSNLAS	185	QHWSSKPPT
P006.038	254	RASSSVTYIH	255	ATSNLAS	256	QHWSS**V**PPT
P005.097	260	RASSSVTYIH	261	ATSNLAS	262	QHWSS**Q**PPT
P005.103	266	RASSSVTYIH	267	ATSNLAS	268	QHWSS**IS**PT
P002.139	272	**H**ASSSVTYIH	273	ATSNLAS	274	QHWSSKPPT
P001.177	278	RASSSVTYIH	279	ATSNLAS	280	QHWSSKPPT
P005.102	284	RASSSVTYIH	285	ATSNLAS	286	QHWSSK**S**PT
P005.102-combo1	290	RASSSVTYIH	291	ATSNLAS	292	QHWSSK**S**PT
P005.102-combo2	296	RASSSVTYIH	297	ATSNLAS	298	QHWSSK**S**PT
P005.103-combo1	302	RASSSVTYIH	303	ATSNLAS	304	QHWSS**IS**PT
P005.103-combo2	308	RASSSVTYIH	309	ATSNLAS	310	QHWSS**IS**PT
P006.038-combo1	314	RASSSVTYIH	315	ATSNLAS	316	QHWSS**V**PPT
P006.038-combo2	320	RASSSVTYIH	321	ATSNLAS	322	QHWSS**V**PPT

10.3 Generación y caracterización de anticuerpos biespecíficos derivados de A5H1EL1D madurados por afinidad

10.3.1 Clonación, producción y purificación de anticuerpos biespecíficos

Los dominios variables de todos los clones se sintetizaron y se clonaron en plásmidos que codificaban una molécula biespecífica de IgG 1+1 con base en las mutaciones botón en ojal y la tecnología CrossMab en combinación con mutaciones PG-LALA. La segunda porción de unión era específica para CD28. Una descripción esquemática de las moléculas finales se ilustra en la **figura 1J**. Las moléculas resultantes se componen por las secuencias enumeradas en la tabla 24: Todas las combinaciones de cadenas que

expresaban las secuencias VL y VH de los aglutinantes madurados por afinidad (SEQ ID NOs: 323-348) se combinaron con las dos cadenas específicas para CD28 (SEQ ID NOs: 349 y 350).

Los constructos resultantes fueron preparados por Evitria usando el sistema de vectores de su propiedad con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó medio sin suero y sin componentes animales de su propiedad (eviGrow y eviMake2) y el reactivo de transfección de su propiedad (eviFect). Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad usando proteína A. La elución se logró a pH 3,0 y luego mediante neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

Tabla 24: Secuencias de aminoácidos de los clones anti-CEA madurados por afinidad seleccionados en formato biespecífico de IgG1 humana P326G LALA

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
A5H1EL1D	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	323	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	324	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
P006.038	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	325	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	326	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKN TLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.097	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	327	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSQPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	328	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKN TLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFSFDYWGQGTTVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.103	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	329	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
	VH-Ck	330	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFYFDYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P002.139	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	331	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	332	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNWVRQAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P001.177	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	333	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	334	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.102	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-	335	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
	LALA)		LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	336	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKN TLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.102-combo1	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	337	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	338	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVR QAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.102-combo2	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	339	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSKSPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	340	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFSDYYMNWVR QAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFQFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
P005.103-combo1	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	341	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	342	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQ APGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSKN TLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDYWGQGTTVTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P005.103-combo2	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	343	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSISPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYYMNWVR QAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFSFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P006.038-combo1	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	345	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

Clon	cadena	SEQ ID NO	Secuencia de polipéptidos
	VH-Ck	346	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFYFTDYAMNWVR QAPGKGLEWLGVISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
P006.038-combo2	VL-CH1-IgG1 Fc-(ojal, PG-LALA)	347	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPG QAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSVPPTFGQGTKLEIKSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
	VH-Ck	348	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEMNWVR QAPGKGLEWLGFISNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGIRFGFDYWGQGTTV TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD28 (SA_Variante 15)	VH-CH1-IgG1 Fc (botón, PG-LALA)	349	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQ APGQGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
	VL-Ck	350	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVFLNWYQQKP GKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

10.3.2 Determinación de afinidad de anticuerpos seleccionados mediante SPR

La afinidad (K_D) del anticuerpo de origen A5H1EL1D así como sus derivados madurados por afinidad se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C.

Alrededor de 2000, 1000, 500 y 250 RU de N(A2B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en 4 canales de un chip NLC cubierto con estreptavidina en orientación vertical. Como un control para unión no específica, 2000 RU de proteína NA(B2)A-avi-His biotinilada se inmovilizaron en el canal 5. Para la determinación de la afinidad (K_D) de los constructos biespecíficos purificados, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal. Series de dilución de dos veces de IgG biespecíficas purificadas (rangos de concentración que variaban entre 25 y 1,56 nM) se inyectaron de manera simultánea a 100 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 180 s y tiempos de disociación de 1200 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. La regeneración se realizó con 10 mM de glicina pH 1,5 durante 20 s a 50 ul/min (orientación vertical).

Las constantes de velocidad de asociación (kon) y las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibro (K_D) se calculó como la relación koff/kon. Todos los datos cinéticos y termodinámicos se enumeran en la tabla 25. Se observó mayor afinidad (valores de K_D más bajos) para los clones madurados por afinidad que se identificaron por medio de la selección de expresión en fago. Además, se evaluaron las combinaciones con CDR intercambiadas y las posiciones CDR. Mientras que algunas combinaciones (por ejemplo, clones "P005.103-combo2" y "P005.102-combo1") produjeron velocidades de disociación muy lentas y, en consecuencia, afinidades muy altas, la afinidad se redujo de manera significativa en 2 clones combinatorios (clones "P006.038-combo1" y "P006.038-combo2").

Tabla 25: Determinación de parámetros cinéticos y termodinámicos de constructos biespecíficos CEA-CD28 purificados mediante SPR

Clon ID	k on (1/Ms)	k off (1/s)	K_D (nM)
A5H1EL1D	1,58E+5	3,33E-4	2,11

Clon ID	k on (1/Ms)	k off (1/s)	K_D (nM)
P006.038	2,67E+5	5,87E-5	0,22
P005.097	2,69E+5	8,87E-5	0,33
P005.103	2,57E+5	1,12E-4	0,44
P002.139	2,49E+5	9,70E-5	0,39
P001.177	2,05E+5	8,83E-5	0,43
P005.102	1,60E+5	3,31E-5	0,20
P005.102-combo1	2,07E+5	1,23E-5	0,06
P005.102-combo2	2,25E+5	1,85E-5	0,08
P005.103-combo1	1,26E+5	3,42E-5	0,27
P005.103-combo2	1,23E+5	1,05E-5	0,09
P006.038-combo1	1,78E+5	7,99E-5	4,48
P006.038-combo2	1,91E+5	6,98E-4	3,66

Ejemplo 11

Generación y producción de otras moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y antígeno carcinoembrionario (CEA)

11.1 Clonación de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno

Para la generación de los plásmidos de expresión, las secuencias de los respectivos dominios variables se usaron y se subclonaron en la estructura con las respectivas regiones constantes preinsertadas en el respectivo vector de expresión mamífero receptor. Una descripción esquemática de las moléculas resultantes se muestra en la **figura 23**. En el dominio Fc, se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a receptores Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2012/130831. Para la generación de anticuerpos biespecíficos, los fragmentos Fc contenían las mutaciones “botón” (mutaciones S354C/T366W, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) o mutaciones “ojal” (mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V de acuerdo con el índice EU

de Kabat) para evitar el error de apareamiento de las cadenas pesadas. A fin de evitar el error de apareamiento de las cadenas livianas en las moléculas biespecíficas de unión al antígeno, un intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa se introdujo en una porción de unión (tecnología CrossFab). En otra porción de unión, se introdujeron cargas en los dominios CH1 y Ckappa como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/150447. La generación y preparación del clon anti-CEA T84.66 se describe en WO 2016/075278 A2.

Las siguientes moléculas se clonaron, una ilustración esquemática de estas se muestra en las **figuras 23A a 23D**:

Molécula 11A: formato CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 351, 352, 353 y 354 (P1AE4773).

Molécula 11B: formato CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 8) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 351, 352, 355 y 356 (P1AE4774).

Molécula 11C: formato CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 351, 352, 357 y 358 (P1AE4775).

Molécula 11D: formato CEA(A5H1EL1D)-CD28(SA_Variante 29) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 29) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 351, 352, 359 y 354 (P1AE4776).

Molécula 11E: formato CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28(SA) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23B**) que

comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 360, 361, 362 y 363 (P1AE4777).

Molécula 11F: formato CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 8) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 360, 361, 364 y 365 (P1AE4780).

Molécula 11G: formato CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 15) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 360, 361, 366 y 367 (P1AE4791).

Molécula 11H: formato CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 29) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(A5H1EL1D) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 360, 361, 368 y 363 (P1AE4793).

Molécula 11I: formato CEA(T84.66)-CD28(SA) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 369, 370, 353 y 354 (P1AE6488).

Molécula 11J: formato CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 29) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 29) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA (T.84.66) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 369, 370, 359 y 354 (P1AE6495).

Molécula 11K: formato CEA(T84.66)-CD28(SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 369, 370, 357 y 358 (P1AE6557).

Molécula 11L: formato CEA(T84.66)-CD28(SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica

huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 8) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 369, 370, 355 y 356 (P1AE6556).

Molécula 11M: formato CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 29) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 29) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 371, 372, 368 y 363 (P1AE9605).

Molécula 11N: formato CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 8) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 371, 372, 366 y 367 (P1AE9606).

Molécula 11O: formato CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 15) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento CEA(T84.66) Fab (ojal) (**figura 23B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 371, 372, 364 y 365 (P1AE9607).

Molécula 11P: CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA-Variante 29) 2+1, constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (SA_Variante 29) y bivalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA CrossFab, modificaciones cargadas en ambos fragmentos anti-CEA Fab fusionados de cabeza a cola entre sí (ojal), intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD28 CrossFab (botón) (**figura 23C**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 368, 362, 361 y 373 (P1AE6924).

Molécula 11Q: CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29) 2+1, constructo biespecífico monovalente anti-CD28 (SA) y bivalente anti-CEA huIgG1 PG-LALA CrossFab, “orientación clásica”, intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD28 CrossFab, modificación cargada en ambos fragmentos anti-CEA Fab (**figura 23D**)**.** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 368, 374, 361 y 360 (P1AE6925).

Molécula 11R: formato CEA(P002.139)-CD28(SA_Variante 15) 1+1, molécula

biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA(P002.139) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 375, 376, 357 y 358 (P1AE8371).

Molécula 11S: formato CEA (P002.139)-CD28 (SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 8) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA (P002.139) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 375, 376, 355 y 356 (P1AF1115).

Molécula 11T: formato CEA (P002.139)-CD28 (SA_Variante 11) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 11) Fab (botón) e intercambio VH/VL en fragmento CEA (P002.139) Fab (ojal) (**figura 23A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 375, 376, 355 y 354 (P1AF1116).

Las siguientes variantes de anticuerpo anti-CD28 se realizaron con fines de comparación:

Molécula 11U: anticuerpo contra CD28(SA_Variante 8) (PG-LALA), CD28 (SA_Variante 8) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:377 y SEQ ID NO:378 (P1AE7035).

Molécula 11V: anticuerpo contra CD28(SA_Variante 11) (PG-LALA), CD28 (SA_Variante 11) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:379 y SEQ ID NO:380 (P1AE7036).

Molécula 11W: anticuerpo contra CD28(SA_Variante 15) (PG-LALA), CD28 (SA_Variante 15) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:381 y SEQ ID NO:382 (P1AE7037).

Molécula 11X: anticuerpo contra CD28(SA_Variante 27) (PG-LALA), CD28 (SA_Variante 27) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:383 y SEQ ID NO:384 (P1AE7038).

Molécula 11Y: anticuerpo contra CD28(SA_Variante 29) (PG-LALA), CD28 (SA_Variante 29) en un isotipo huIgG1 PG-LALA **(figura 1B)** comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:385 y SEQ ID NO:386 (P1AE7039).

11.2 Producción de las moléculas

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente era impulsada por un promotor de MPSV quimérico o un promotor de CMV. La poliadenilación era impulsada por una secuencia de señal poliA sintética ubicada en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia EBV OriP para la replicación autosómica.

Para la producción de las moléculas 11A a 11D y 11I a 11T, se cotransfectaron células HEK293-EBNA que crecen en suspensión con los respectivos vectores de expresión usando polietilenimina como reactivo de transfección. Los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 EBNA. Las células se centrifugaron y el medio se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en medio CD CHO, se agregó PEI, la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se mezclaron con la solución PEI/ADN, se transfirieron a un matraz de agitación y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera al 5 % de CO_2. Luego de la incubación, se agregó medio Excell con suplementos (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Un día después de la transfección, se agregaron suplementos (alimentación) (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Los sobrenadantes celulares se recolectaron luego de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y se purificaron mediante métodos estándar.

Las moléculas 11U, 11V, 11W, 11X y 11Y fueron producidas y purificadas por Evitria usando el sistema de vectores de su propiedad con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó medio sin suero y sin componentes animales de su propiedad (eviGrow y eviMake2) y el reactivo de transfección de su propiedad (eviFect). El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y se purificó mediante métodos estándar. Las moléculas 11E, 11F, 11G y 11H fueron producidas y purificadas por Proteros de acuerdo con sus protocolos y métodos estándar.

11.3 Purificación de las moléculas

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con

protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,5; amortiguador de elución: 20 mM de citrato de sodio, pH 3,0). La elución se logró a pH 3,0 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15 (Art.N.º: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

11.4 Datos analíticos de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y antígeno carcinoembrionario (CEA)

La concentración de proteínas purificadas se determinó al medir la absorción a 280 nm, usando el coeficiente de extinción de masa calculado en función de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al*., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor usando un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido agregado se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna de exclusión por tamaño analítica (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de L-Arginina monoclorhidrato, pH 6,7 o 200 mM de KH_2PO_4, 250 mM de KCl pH 6,2, respectivamente). Una síntesis de los parámetros de purificación de todas las moléculas se proporciona en la **tabla 26.**

Tabla 26: Síntesis de la producción y purificación de moléculas de unión al antígeno CD28 11A a 11Y

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
11A	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA) 1+1	11,4	0 / 100 / 0	97,8
11B	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8) 1+1	11,3	0 / 100 / 0	98,2
11C	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante	45,1	0 / 100 / 0	97,1

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
	15) 1+1			
11D	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29) 1+1	58,1	0 / 100 / 0	96,6
11E	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA, entrecruzada) 1+1	N/A	0,97 / 95,2 / 3,93	98,8
11F	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8, entrecruzada) 1+1	N/A	0,3 / 96,83 / 2,86	96,43
11G	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15, entrecruzada) 1+1	N/A	0,1 / 98,34 / 1,56	97,9
11H	CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29, entrecruzada) 1+1	N/A	1,07 / 96,03 / 2,9	95,79
11I	CEA (T84.66) - CD28 (SA) 1+1		N/A	
11J	CEA (T84.66) - CD28 (SA_variante 29) 1+1	25,2	3,33 / 96,14 / 0,53	97,8
11K	CEA (T84.66) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	3	5,19 / 93,06 / 1,75	96,32
11L	CEA (T84.66) - CD28 (SA_Variante 8) 1+1	7,8	5,12 / 95,5 / 1,84	95,5
11M	CEA (T84.66)-CD28 (SA_variante 29, entrecruzada) 1+1		N/A	
11N	CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 15, entrecruzada) 1+1		N/A	
11O	CEA (T84.66)-CD28 (SA_Variante 8, entrecruzada) 1+1		N/A	
11P	CEA (A5H1EL1D, cabeza a cola) - CD28		N/A	

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
	(SA_variante 29) 2+1			
11Q	CEA (A5H1EL1D) - CD28 (SA_variante 29) 2+1, clásica		N/A	
11R	CEA(P002.139)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1	7,27	044 / 99,56 / 0	100
11S	CEA(P002.139)-CD28 (SA_Variante 8) 1+1	12	0,57 / 97,68 / 1,75	99,44
11T	CEA(P002.139)-CD28 (SA_Variante 11) 1+1	7,25	0,7 / 96,61 / 2,69	95,1
11U	CD28 (SA_Variante 8) IgG1 PG LALA	N/A	0 / 98,43 / 1,57	80,2
11V	CD28 (SA_Variante 11) IgG1 PG LALA	N/A	0 / 98,52 / 1,48	72,5
11W	CD28 (SA_Variante 15) IgG1 PG LALA	N/A	1,49 / 97,44 / 1,07	82
11X	CD28 (SA_Variante 27) IgG1 PG LALA	N/A	1,46 / 97,15 / 1,39	84,6
11Y	CD28 (SA_Variante 29) IgG1 PG LALA	N/A	1,02 / 97,3 1,68	84,4

11.5 Análisis de unión de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y antígeno carcinoembrionario (CEA) mediante SPR

La afinidad (K_D) por CD28 de las moléculas 10A-10D, que tienen el anticuerpo anti-CEA A5H1EL1D y las variantes de aglutinante anti-CD28 8, 11 y 29 así como el aglutinante original CD28(SA), se midieron mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando una máquina Proteon XPR36. Para la inmovilización de antígeno recombinante (ligando), huCD28-Fc se diluyó con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005 % de Tween 20) hasta concentraciones que variaban de 100 a 500 nM, y luego se inyectaron a 25 µL/minuto en diversos tiempos de contacto. Esto produjo niveles

de inmovilización entre 500 y 3000 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical.

Para la determinación de la afinidad (K_D) de las moléculas purificadas, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal. Series de dilución de dos veces de constructos purificados (rangos de concentración que variaban entre 100 y 6,25 nM) se inyectaron de manera simultánea a 100 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 150 s y tiempos de disociación de 400 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco "en línea" para referencia. La regeneración se realizó con 10 mM de glicina pH 1,5 durante 35 s a 50 µl/min (orientación vertical). Las constantes de velocidad de asociación (kon) y las constantes de velocidad de disociación (koff) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibro (KD) se calculó como la relación koff/kon. Los datos cinéticos y termodinámicos se enumeran en la **tabla 27**.

Tabla 27: análisis cinético y termodinámico de variantes anti-CD28 en moléculas biespecíficas 11A a 11D

Molécula biespecífica	k_{on} (1/(s*M)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
CEA (A5H1EL1D)-CD28 (SA) 1+1	3,77E+5	2,94E-4	0,8
CEA (A5H1EL1D)-CD28 (CD28(SA_Variante 8) 1+1	1,69E+5	9,80E-3	58
CEA (A5H1EL1D)-CD28 (CD28(SA_Variante 15) 1+1	2,59E+5	2,64E-3	10
CEA (A5H1EL1D)- CD28 (CD28(SA_Variante 29) 1+1	2,71E+5	3,24E-4	1,2

11.6 Caracterización bioquímica de las variantes de IgG anti-CD28 y moléculas biespecíficas de unión al antígeno anti-CD28 que actúan sobre CEA seleccionadas 1+1

A fin de caracterizar y comparar sus propiedades bioquímicas y biofísicas, las siguientes

moléculas se analizaron en detalle: moléculas variantes biespecíficas anti-CD28 que actúan sobre CEA 10A-10D y moléculas variantes de IgG anti-CD28 10U-10Y. Los resultados se resumen en las tablas 27 y 28.

Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)

La hidrofobicidad aparente se determinó al inyectar 20 µg de muestra en una columna HIC-Ether-5PW (Tosoh) equilibrada con 25 mM de fosfato de Na, 1,5 M de sulfato de amonio, pH 7,0. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 100 % de amortiguador B (25 mM de fosfato de Na, pH 7,0) dentro de 60 minutos. Los tiempos de retención se compararon con estándares de proteínas con hidrofobicidad conocida. La mayoría de anticuerpos presentaron un tiempo de retención relativo entre 0 y 0,35.

Estabilidad térmica

Las muestras se prepararon a una concentración de 1 mg/ml en 20 mM de histidina/cloruro de histidina, 140 mM de NaCl, pH 6,0, se transfirieron a una placa óptica de 384 cavidades mediante centrifugación a través de una placa de filtro de 0,4 µm y se cubrieron con aceite de parafina. El radio hidrodinámico se midió repetidamente mediante dispersión de luz dinámica en un lector de palcas DynaPro (Wyatt), mientras que las muestras se calentaban con una velocidad de 0,05 °C/min de 25 °C a 80 °C.

Cromatografía de afinidad de FcRn

FcRn se expresó, se purificó y se biotiniló como se describe en Cymer, Schlothauer *et al*., Bioanalysis 2017, 9(17), doi.org/10.4155/bio-2017-0109. Para el acoplamiento, el receptor preparado se agregó a estreptavidina-sefarosa (GE Healthcare). La matriz de FcRn-sefarosa resultante de empaquetó en la carcasa de una columna. La columna se equilibró con 20 mM de ácido 2-(N- morfolin)-etansulfónico (MES), 140 mM de NaCl, pH 5,5 (eluyente A) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. 30 µg de muestras de anticuerpo se diluyeron a una relación en volumen de 1:1 con eluyente A y se aplicaron a la columna FcRn. La columna se lavó con 5 volúmenes de columna de eluyente A, y luego se sometió a elución con un gradiente lineal de 20 a 100 % 20 mM de Tris/HCl, 140 mM de NaCl, pH 8,8 (eluyente B) en 35 volúmenes de columna. El análisis se realizó con un horno de columna a 25 °C. El perfil de elución se controló mediante la medición continua de la absorbancia a 280 nm. Los tiempos de retención se compararon con estándares de proteínas con afinidades conocidas. La mayoría de anticuerpos presentaron un tiempo de retención relativo entre 0 y 1.

Cromatografía de afinidad de heparina

La afinidad de heparina se determinó al inyectar 30-50 µg de una columna TSKgel Heparin-5PW (Tosoh) equilibrada con 50 mM de Tris, pH 7,4. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 100 % de amortiguador B (50 mM de Tris, 1 M de NaCl, pH 7,4 mM) dentro de 37 minutos. Los tiempos de retención se compararon con estándares de proteínas con afinidades conocidas.

Todas las variantes de secuencias evaluadas alcanzaron todos los criterios y no difirieron de manera significativa entre sí con respecto a todas las propiedades biofísicas y bioquímicas (tablas 28 y 29).

Tabla 28: Propiedades biofísicas y bioquímicas de las variantes de IgG anti-CD28 evaluadas 10U-10Y

Muestra	**Estabilidad térmica (°C)**	**Hidrofobicidad aparente**	**Afinidad de FcRn**	**Afinidad de heparina**
CD28 (SA_variante 8) IgG1 PG LALA	79	0,218	0,17	0,58
CD28 (SA_variante 11) IgG1 PG LALA	78	0,313	0,21	0,58
CD28 (SA_variante 15) IgG1 PG LALA	79	0,265	0,25	0,59
CD28 (SA_variante 27) IgG1 PG LALA	78	0,194	0,28	0,59
CD28 (SA_variante 29) IgG1 PG LALA	78	0,308	0,37	0,59

Tabla 29: Propiedades biofísicas y bioquímicas de las moléculas variantes biespecíficas anti-CD28 que actúan sobre CEA evaluadas 11A-11D

Muestra	**Estabilidad térmica (°C)**	**Hidrofobicidad aparente**	**Afinidad de FcRn**	**Afinidad de heparina**
CEA (A5H1EL1D) - CD28 (SA) 1+1	70	0,22	0,21	0,66

CEA (A5H1EL1D) - CD28 (SA_Variante 8) 1+1	67	0,17	0,08	0,66
CEA (A5H1EL1D) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	70	0,19	0,1	0,66
CEA (A5H1EL1D) - CD28 (SA_Variante 29) 1+1	70	0,22	0,17	0,67

Ejemplo 12

Caracterización funcional *in vitro* de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y antígeno carcinoembrionario (CEA)

12.1 Unión a CEACAM5 en células MV3 que expresan CEA

A fin de evaluar si la maduración por afinidad de A5H1EL1D producía una unión mejorada a CEACAM5, se realizó un ensayo de unión FACS en células MV3 modificadas por ingeniería genética para expresar CEA. Como se muestra en la **figura 24**, un anticuerpo biespecífico contra CEA-CD28 (molécula 11R, P1AE8371) que tenía el clon P002.139 anti-CEA madurado por afinidad mostró una unión superior (EC_{50} = 4,1 nM) a CEACAM5 que el clon A5H1EL1D (molécula 11C, P1AE4775) (EC_{50} = 20,4 nM).

12.2 Ensayo indicador de IL-2 para analizar la funcionalidad *in vitro* de anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 en combinación con TCB que actúan sobre CEA

Las células indicadoras de IL-2 (J1631, Promega) son linfocitos T Jurkat modificados por ingeniería genética que expresan un indicador de luciferasa impulsado por un promotor de IL-2. A fin de evaluar la capacidad de los agonistas de CD28 que actúan sobre CEA para mejorar la función efectora de linfocitos T mediada por TCB, 10000 células MKN45/cavidad se incubaron con 10^5 células indicadoras de IL-2 (relación E:T 10:1) con una concentración fija de CEA-TCB (5 nM) y un rango de concentración de anticuerpos biespecíficos contra CEA-CD28 (14 pM – 10 nM). Luego de 6 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO_2, la luminiscencia se evaluó usando OneGlo (E6120, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron por medio de un lector de placas Tecan Spark 10M.

La funcionalidad del anticuerpo biespecífico contra CEA-CD28 que tiene el clon P002.139

anti-CEA madurado por afinidad (molécula 11R, P1AE8371) o el clon A5H1EL1D (molécula 11C, P1AE4775) se evaluó usando un ensayo celular indicador de IL-2 en combinación con CEA-TCB (5 nM) y en presencia de células MKN45 que expresaban CEA. Como se muestra en las **figuras 25A** y **25B**, la afinidad mejorada del clon P002.139 madurado por afinidad se tradujo en una mayor potencia en la capacidad coestimuladora en comparación con el clon A5H1EL1D.

Ejemplo 13

Caracterización funcional *in vivo* de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y antígeno carcinoembrionario (CEA) en combinación con CEA TCB

13.1 Estudio de eficacia con moléculas biespecíficas de unión al antígeno CEA-CD28 con diferentes dominios de unión al antígeno CEA en combinación con CEA-TCB en xenoinjerto de MKN45 en ratones humanizados

El estudio de eficacia descrito en la presente buscaba comprender la potencia dependiente del clon de CEA de la molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28 en combinación con CEA-TCB en términos de regresión tumoral en ratones NSG totalmente humanizados.

Las células MKN45 humanas (carcinoma gástrico humano) se obtuvieron originalmente de ATCC y luego de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Glycart. Las células se cultivaron en DMEM que contenía 10 % de FCS a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 5 % de CO_2. El pasaje *in vitro* 12 se usó para inyección subcutánea con una viabilidad de 97 %. 50 microlitros de suspensión celular ($1x10^6$ células MKN45) mezclados con 50 microlitros de Matrigel se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones anestesiados con una aguja de 22 G a 30 G.

Los ratones NSG hembra, de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (Jackson Laboratory), se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las pautas previstas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH225-17). Luego de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para observación. Se realizó un control continuo de la salud de manera regular.

A los ratones NSG hembra se les inyectó i.p. con 15 mg/kg de busulfán y un día después

se les dio una inyección i.v. de $1x10^5$ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 luego de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones de manera sublingual y la sangre se analizó mediante citometría de flujo para la humanización exitosa. Los ratones injertados eficazmente se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento. En ese momento, los ratones se inyectaron con células tumorales s.c. como se describió (**figura 26**, d0) y se trataron con los compuestos o amortiguador de histidina (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3 (día 13). Todos los ratones se inyectaron i.v. con 200 µl de la solución adecuada. A fin de obtener la cantidad adecuada de compuestos por 200 µl, las soluciones de reserva (tabla 30) se diluyeron con amortiguador de histidina de ser necesario.

Tabla 30: Composiciones usadas en el experimento *in vivo*

Compuesto	Amortiguador de formulación	Concentración (mg/ml)
CEA-TCB	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	4,82 (= solución de reserva)
CEA(T84.66)-CD28 (SA_Variante 15)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	1,71 (= solución de reserva)
CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	3,89 (= solución de reserva)

Para tratamientos conjuntos (grupo C y D, figura 26) con CEA-CD28 y CEA-TCB las moléculas biespecíficas se inyectaron de manera concomitante. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana usando un calibrador y el volumen tumoral se calculó como se muestra a continuación:

Tv: $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: longitud)

Los valores de inhibición de crecimiento tumoral como una medición de potencia *in vivo* se calcularon con un programa estadístico interno de Roche como se muestra a continuación:

$$TGI: \frac{100 - Av\left(T\_tratamiento^{[día\ x]} - T\_tratamiento^{[inicial]}\right)}{Av\left(T\_vehículo^{[día\ x]} - T\_vehículo^{[inicial]}\right)} \times 100$$

El estudio finalizó en el día 39. La **figura 27A** muestra la cinética de crecimiento tumoral (media, +SEM) así como la cinética de crecimiento tumoral individual por grupo y ratón (**figuras 27B a 27E**). Como se describe en la presente, CEA-TCB, como agente único indujo poca inhibición de crecimiento tumoral. No obstante, las combinaciones con ambas moléculas CEA-CD28 mostraron inhibición de crecimiento tumoral mejorada. En especial, la combinación de CEA-TCB con CEA-CD28 que contenía el aglutinante de afinidad más baja para CEA (A5H1EL1D) produjo una regresión de crecimiento tumoral superior. Como se muestra en la tabla 31, los valores de TGI más altos (TGI: 116 %) se calcularon para el grupo de combinación de CEA-TCB con CEA-CD28 (huA5B7), lo que indicó los efectos antitumorales más fuertes. TGI significa inhibición de crecimiento tumoral, TGI > 100 significa regresión tumoral y TGI = 100 se define como estasis tumoral.

Tabla 31: TGI en el día 39 del estudio (vehículo como grupo de control)

Grupo	TGI
CEA TCB	69
CEA TCB + CEA(T84.66)-CD28 (SA_Variante 15)	89
CEA TCB + CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15)	116

13.2 Estudio de eficacia con moléculas biespecíficas de unión al antígeno CEA-CD28 con tres diferentes dominios de unión al antígeno CD28 en combinación con CEACAM5-TCB y anticuerpo anti-PDL1 en xenoinjerto de BXPC3 en ratones humanizados

Este estudio de eficacia buscaba comprender el impacto de la afinidad del dominio de unión al antígeno CD28 de las moléculas CEA-CD28 en combinación con CEACAM5-

TCB y anti-PD-L1 en términos de regresión tumoral y patrones de inmuno-PD en ratones NSG totalmente humanizados. Tres diferentes variantes de afinidad se evaluaron en el presente estudio (Variante 8 < Variante 15 < Variante 29).

Las células BXPC3 humanas (línea de células de cáncer de páncreas humano) se obtuvieron originalmente de ECACC (Colección europea de cultivos celulares) y luego de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Roche Glycart. Las células BXPC3 se cultivaron en RPMI que contenía 10 % de FCS (PAA Laboratories, Austria) con 1 % de Glutamax. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 5 % de CO_2. El pasaje *in vitro* 20 se usó para inyección s.c. con una viabilidad > 95 %. 50 microlitros de suspensión celular ($1x10^6$ células BXPC3) mezclados con 50 microlitros de Matrigel se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones anestesiados con una aguja de 22 G a 30 G.

Los ratones NSG hembra, de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (Jackson Laboratory), se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las pautas previstas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH225-17). Luego de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para observación. Se realizó un control continuo de la salud de manera regular.

A los ratones NSG hembra se les inyectó i.p. con 15 mg/kg de busulfán y un día después se les dio una inyección i.v. de $1x10^5$ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 luego de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones de manera sublingual y la sangre se analizó mediante citometría de flujo para la humanización exitosa. Los ratones injertados eficazmente se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento A a F. En ese momento, los ratones se inyectaron con células tumorales s.c. como se describe en la **figura 28** y se trataron con los compuestos o amortiguador de histidina (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3 (día 20). Todos los ratones se inyectaron i.v. con 200 µl de la solución adecuada. A fin de obtener la cantidad adecuada de compuestos por 200 µl, las soluciones de reserva (tabla 32) se diluyeron con amortiguador de histidina de ser necesario.

Tabla 32: Composiciones usadas en el experimento *in vivo*

Compuesto	Amortiguador de formulación	Concentración (mg/ml)
CEACAM5-TCB	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	20,5 (= solución de reserva)
anti-PD-L1 (Atezolizumab)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	60 (= solución de reserva)
CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	3,78 (= solución de reserva)
CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	3,89 (= solución de reserva)
CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	5,01 (= solución de reserva)

En la finalización (día 52), los ratones se sacrificaron, los tumores se extrajeron, se pesaron, y se prepararon suspensiones unicelulares a través de una digestión enzimática con colagenasa V y ADNasa para posterior análisis FACS. Las células únicas se tiñeron para obtener CD45, CD3, CD8 y CD4 humano y se analizaron en FACS BDFortessa.

La **figura 29** muestra la cinética del crecimiento del tumor (media, +SEM) para todos los grupos de tratamiento, los valores de TGI correspondientes de cada grupo de tratamiento se muestran en la tabla 33 a continuación. Como se describe en la presente, la monoterapia con CEACAM5 TCB así como la combinación con a-PD-L1 indujeron poca inhibición de crecimiento tumoral. Solo la adición de CEA-CD28 (SA_Variante 8) a la combinación de CEACAM5-TCB y a-PD-L1 produjo un aumento en la inhibición de

crecimiento tumoral (TGI: 75 %). Ni la variante 15 ni la variante 29 aumentaron los efectos antitumorales. Curiosamente, los datos de inmuno-PD (**figuras 30A-D**) de los tumores de animales sacrificados en la finalización del estudio revelaron que la inhibición de crecimiento tumoral adicional inducida por CEA-CD28 variante 8 también se reflejó en un aumento en la frecuencia de linfocitos T intratumorales. La **figura 30A** muestra gráficos de puntos representativos de las suspensiones de célula única tumoral teñida de cada grupo de tratamiento. La síntesis de la infiltración de los linfocitos T CD3, CD8 y CD4 se ilustra en las **figuras 30B**, **30C** y **30D**, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas en los grupos tratados con CEA-CD28 (SA_Variante 15) o CEA-CD28 (SA_Variante 29) en comparación con CEACAM5-TCB solo o combinación con a-PD-L1 en términos de infiltración de linfocitos T en el tumor. Los efectos de inmuno-PD más fuertes se detectaron con CEA-CD28 (SA_Variante 8).

Tabla 33: TGI en el día 52 del estudio (vehículo como grupo de control)

Grupo	TGI
CEACAM5 TCB	35
CEACAM5 TCB + a-PD-L1	17
CEACAM5 TCB + a-PD-L1 + CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8)	75
CEACAM5 TCB + a-PD-L1 + CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 15)	37
CEACAM5 TCB + a-PD-L1 + CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 29)	35

13.3 Estudio de eficacia con molécula biespecífica de unión al antígeno CEA-CD28 en combinación con CEA TCB en xenoinjerto de MKN45 en ratones NSG humanizados

El estudio de eficacia descrito en la presente buscaba estudiar la combinación de CEA-TCB y CEA-CD28 (SA_Variante 8) en un segundo modelo de xenoinjerto humano en términos de regresión tumoral y patrones de inmuno-PD en ratones NSG totalmente humanizados.

Las células MKN45 humanas (carcinoma gástrico humano) se obtuvieron originalmente

de ATCC y luego de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Glycart. Las células se cultivaron en DMEM que contenía 10 % de FCS a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 5 % de CO_2. El pasaje *in vitro* 12 se usó para inyección subcutánea con una viabilidad de >95 %. 50 microlitros de suspensión celular ($1x10^6$ células MKN45) mezclados con 50 microlitros de Matrigel se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones anestesiados con una aguja de 22 G a 30 G. Los ratones NSG hembra, de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (Jackson Laboratory), se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las pautas previstas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH225-17). Luego de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para observación. Se realizó un control continuo de la salud de manera regular.

A los ratones NSG hembra se les inyectó i.p. con 15 mg/kg de busulfán y un día después se les dio una inyección i.v. de $1x10^5$ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 luego de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones de manera sublingual y la sangre se analizó mediante citometría de flujo para la humanización exitosa. Los ratones injertados eficazmente se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento. En ese momento, los ratones se inyectaron con células tumorales s.c. como se describe en la **figura 31** y se trataron con las moléculas o amortiguador de histidina (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3 (día 13). Todos los ratones se inyectaron i.v. con 200 µl de la solución adecuada. A fin de obtener la cantidad adecuada de compuestos por 200 µl, las soluciones de reserva (tabla 34) se diluyeron con amortiguador de histidina de ser necesario.

Tabla 34: Composiciones usadas en el experimento *in vivo*

Compuesto	Amortiguador de formulación	Concentración (mg/ml)
CEA-TCB	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	4,82 (= solución de reserva)

CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	3,78 (= solución de reserva)

Para el tratamiento conjunto (grupo C, figura 31) los constructos se inyectaron de manera concomitante. El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana usando un calibrador y el volumen tumoral se calculó como se muestra a continuación:

Tv: $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: longitud)

Los valores de inhibición de crecimiento tumoral (TGI) como una medición de potencia *in vivo* se calcularon con un programa estadístico interno de Roche como se describe en el ejemplo 12.1 anterior.

En la finalización (día 48), los ratones se sacrificaron, los tumores se extrajeron, se pesaron, y se prepararon suspensiones unicelulares a través de una digestión enzimática con colagenasa V y ADNasa para posterior análisis FACS. Las células únicas se tiñeron para obtener CD45 y CD3 humano y se analizaron en FACS BDFortessa.

La **figura 32** muestra la cinética del crecimiento del tumor (media, +SEM) para todos los grupos de tratamiento, los valores de TGI correspondientes de cada grupo de tratamiento se muestran en la tabla 35 a continuación. Como se describe en la presente, la monoterapia con CEA-TCB indujo inhibición de crecimiento tumoral con un valor de TGI de 84 %. No obstante, el tratamiento conjunto con CEA-CD28 (SA_Variante 8) produjo una inhibición de crecimiento tumoral superior (TGI: 101 %). Además, los datos de inmuno-PD (figura 3) de los tumores de animales sacrificados en la finalización del estudio revelaron que la fuerte inhibición de crecimiento tumoral inducida por CEA-CD28 (SA_Variante 8) en combinación con CEA-TCB también se reflejó en un aumento en la frecuencia de linfocitos T intratumorales. La **figura 33A** muestra gráficos de puntos representativos de las suspensiones de célula única tumoral teñida de cada grupo de tratamiento. La síntesis de la infiltración de los linfocitos T CD3+ se ilustra en la **figura 33B**.

Tabla 35: TGI en el día 48 del estudio (vehículo como grupo de control)

Grupo	TGI
CEA TCB	84
CEA TCB + CEA(A5H1EL1D)-CD28 (SA_Variante 8)	10

Ejemplo 14

Generación y producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y molécula de adhesión a la célula epitelial (EpCAM), HER3, CD30 o glucoproteína trofoblasto (TPBG)

14.1 Clonación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y EpCAM, HER3, CD30 o TPBG

Para la generación de los plásmidos de expresión, las secuencias de los respectivos dominios variables se usaron y se subclonaron en la estructura con las respectivas regiones constantes preinsertadas en el respectivo vector de expresión mamífero receptor. En el dominio Fc, se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a receptores Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2012/130831. Para la generación de anticuerpos biespecíficos, los fragmentos Fc contenían las mutaciones “botón” (mutaciones S354C/T366W, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) o mutaciones “ojal” (mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V de acuerdo con el índice EU de Kabat) para evitar el error de apareamiento de las cadenas pesadas. A fin de evitar el error de apareamiento de las cadenas livianas en las moléculas biespecíficas de unión al antígeno, un intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa se introdujo en una porción de unión (tecnología CrossFab). En otra porción de unión, se introdujeron cargas en los dominios CH1 y Ckappa como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/150447.

La generación y preparación de anticuerpo anti-EpCAM MT201 (adecatumumab) se describe en la patente estadounidense N.º 7.632.925 B2. La producción del anticuerpo anti-HER3 (lumretuzumab) se describe en WO 2011/076683 A1. El anticuerpo anti-CD30

brentuximab se divulga en WO 02/34661 A2. La generación y preparación de anticuerpos anti-TPBG, por ejemplo FAB091, se describe en WO 2017/072207 A1.

Las siguientes moléculas se clonaron, una ilustración esquemática de estas se muestra en las **figuras 34A a 34D**:

Molécula 14A: formato EpCAM (MT201)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 15) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento EpCAM (MT201) Fab (ojal) (**figura 34A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 366, 367, 390 y 391 (P1AE9051).

Molécula 14B: formato HER3(lumretuzumab)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento anti-HER3 Fab (ojal) (**figura 34B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 357, 358, 392 y 393 (P1AF0151).

Molécula 14C: formato CD30(brentuximab)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD30 Fab (ojal) (**figura 34C**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 357, 358, 394 y 395 (P1AF1751).

Molécula 14D: formato TPBG (FAB091)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento anti-TPBG Fab (ojal) (**figura 34D**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 357, 358, 396 y 397 (P1AF1752).

14.2 Producción de las moléculas

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente era impulsada por un promotor de MPSV quimérico o un promotor de CMV. La poliadenilación era impulsada por una secuencia de señal poliA sintética ubicada en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia EBV OriP para la replicación autosómica.

Los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 EBNA o células CHO EBNA. Las células se centrifugaron y

el medio se reemplazó por medio CD CHO precalentado (Thermo Fisher, Cat N.º 10743029). Los vectores de expresión se mezclaron en medio CD CHO, se agregó PEI (polietilenimina, Polysciences, Inc, Cat N.º 23966-1), la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células (2 Mio/ml) se mezclaron con solución PEI/vector, se transfirieron a un matraz y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con agitación con una atmósfera al 5 % de CO_2. Luego de la incubación, se agregó medio Excell con suplementos (80 % de volumen total) (W. Zhou y A. Kantardjieff, Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, DOI: 10.1007/978-3-642-54050-9; 2014). Un día después de la transfección, se agregaron suplementos (alimentación, 12 % de volumen total). Los sobrenadantes celulares se recolectaron luego de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm), y las proteínas se purificaron del sobrenadante recolectado mediante métodos estándar como se indica a continuación.

14.3 Purificación de las moléculas

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,5; amortiguador de elución: 20 mM de citrato de sodio, pH 3,0). La elución se logró a pH 3,0 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15 (Art.N.º: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

14.4 Datos analíticos de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28

La concentración de proteínas purificadas se determinó al medir la absorción a 280 nm, usando el coeficiente de extinción de masa calculado en función de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al*., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor usando un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido agregado se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna de exclusión por tamaño analítica (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de L-Arginina monoclorhidrato, pH 6,7 o 200 mM de KH_2PO_4, 250 mM de KCl pH 6,2,

respectivamente). Una síntesis de los parámetros de purificación de todas las moléculas se proporciona en la **tabla 36.**

Tabla 36: Síntesis de la producción y purificación de moléculas de unión al antígeno CD28 13A a 13D

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
14A	EPCAM (MT201) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	34,6	8,28 / 91,72 / 0	94,24
14B	HER3 (Lumretuzumab) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	60,3	0,14 / 99,65 / 0,21	98,53
14C	CD30 (Brentuximab)- CD28 (SA_Variante 15) 1+1	24,4	0 / 99,45 / 0,5	94,06
14D	TPBG (5T4) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	17,5	0 / 92,6 / 7,4	98,12

Ejemplo 15

Caracterización funcional *in vitro* de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y EpCAM, HER3, CD30 o TPBG

15.1 Unión de EpCAM-CD28 a células que expresan EpCAM y CD28

La unión de EpCAM-CD28 (molécula 14A) que tenía el clon de CD28 Variante 15 de afinidad intermedia (P1AE9051) a EpCAM se evaluó usando células HT-29 (ATCC #HTB-38), y la unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28

humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano).

A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a 0,5 células Mio/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat N.º 00-4222-26). 5E4 células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 1 h a 4 °C con concentraciones en aumento del constructo EpCAM-CD28 (10 pM – 500 nM). Luego, las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 30 min más a 4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 85 ul de amortiguador FACS con DAPI (Roche, Cat. N.º 10236276001) con dilución 1:10000. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism7.

Los ensayos de unión celular *in vitro* verificaron que el anticuerpo agonista biespecífico contra EpCAM-CD28 (P1AE9051) se unía a CD28 humano (**figura 35A**) así como a EpCAM humana en células HT-29 (**figura 35B**) de una manera dependiente de la concentración. Como se esperaba, no se detectó unión con IgG anti-DP47, lo que indicó que la detección de unión se debía a la unión a CD28 y EpCAM específica por parte de las respectivas porciones de direccionamiento.

15.2 Caracterización funcional *in vitro* de molécula EpCAM-CD28 con base en ensayo indicador de IL-2

A fin de evaluar la capacidad de EpCAM-CD28 (molécula 14A) para soportar la activación de linfocitos T mediada por anti-CD3, las células indicadoras de IL-2 (Promega, Cat. N.º J1651) sirvieron como células efectoras (línea de linfocitos T Jurkat que expresa un indicador de luciferasa impulsado por el promotor de IL-2) y HT-29 sirvieron como dianas tumorales. 1E4 células diana tumorales se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo blanco durante 6 h a 37 °C con 5E4 células indicadoras de IL-2 (E:T 5:1) en presencia de 10 nM de anti-CD3 (eBioscience #16-0037-85) solo o en combinación con concentraciones en aumento del constructo EpCAM-CD28 (24 pM – 100 nM). Antes de la medición, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, y luego se agregaron 100 µl de sustrato (solución ONE-Glo, Promega, Cat. N.º E6120) a las células.

Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la luminiscencia (recuentos/s) se midió con un Tecan Spark 10M.

La activación de linfocitos T se evaluó en combinación con un estímulo anti-CD3 subóptimo constante. Con este fin, células Jurkat indicadoras de IL-2 se cocultivaron con células HT29 que expresaban EpCAM durante 6 h en presencia de concentraciones en aumento de EpCAM-CD28 (P1AE9051) y una concentración limitante fija de clon OKT3 de IgG anti-CD3 (10 nM). Como se ilustra en la **figura 35C**, EpCAM-CD28 fue capaz de mejorar la activación de linfocitos T, según se analizó en función de la mayor producción de IL-2 en linfocitos T expuestos a estimulación de CD3 subóptimo de una manera dependiente de la concentración.

15.3 Unión de HER3-CD28 a células que expresan HER3 y CD28

La unión de HER3-CD28 (molécula 14B) que tenía el clon de CD28 Variante 15 de afinidad intermedia (P1AF0151) a HER3 se evaluó usando células T-47D (ATCC #HTB-133), y la unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano).

A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a 0,5 células Mio/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat N.º 00-4222-26). 5E4 células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 1 h a 4 °C con concentraciones en aumento del constructo HER3-CD28 (10 pM – 500 nM). Luego, las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 30 min más a 4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 85 ul de amortiguador FACS con DAPI (Roche, Cat. N.º 10236276001) con dilución 1:10000. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism7.

Análisis FACS

A fin de evaluar el nivel relativo de HER3 en la superficie de T-47D, 2E5 células se centrifugaron a 480 xg durante 5 min y se lavaron con PBS. La tinción superficial para

HER3 (APC anti-humano, BioLegend #324708) se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron una vez con 150 ul/cavidad de PBS y se volvieron a suspender en 150 µl/cavidad de PBS y se analizaron usando BD FACS Fortessa.

Los ensayos de unión celular *in vitro* verificaron que el anticuerpo agonista biespecífico contra HER3-CD28 (molécula 14B) se unía a CD28 humano (**figura 36A**) así como a HER3 humano (**figura 36B**) en células de una manera dependiente de la concentración. Como se esperaba, no se detectó unión con IgG anti-DP47, lo que indicó que la detección de unión se debía a la unión a CD28 y HER3 específica por parte de las respectivas porciones de direccionamiento.

15.4 Caracterización funcional *in vitro* de molécula HER3-CD28 con base en ensayo indicador de IL-2

A fin de evaluar la capacidad de HER3-CD28 (molécula 14B) para soportar la activación de linfocitos T mediada por anti-CD3, las células indicadoras de IL-2 (Promega, Cat. N.º J1651) sirvieron como células efectoras (línea de linfocitos T Jurkat que expresa un indicador de luciferasa impulsado por el promotor de IL-2) y T-47D sirvieron como dianas tumorales. 1E4 células diana tumorales se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo blanco durante 6 h a 37 °C con 5E4 células indicadoras de IL-2 (E:T 5:1) en presencia de 10 nM de anti-CD3 (eBioscience #16-0037-85) solo o en combinación con concentraciones en aumento del constructo HER3-CD28 (24 pM – 100 nM). Antes de la medición, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, y luego se agregaron 100 ul de sustrato (solución ONE-Glo, Promega, Cat. N.º E6120) a las células. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la luminiscencia (recuentos/s) se midió con un Tecan Spark 10M.

La activación de linfocitos T se evaluó en combinación con un estímulo anti-CD3 subóptimo constante. Con este fin, células Jurkat indicadoras de IL-2 se cocultivaron con células HT29 que expresaban EpCAM durante 6 h en presencia de concentraciones en aumento de HER3-CD28 (P1AF0151) y una concentración limitante fija de clon OKT3 de IgG anti-CD3 (10 nM). Como se ilustra en la **figura 36C**, EpCAM-CD28 fue capaz de mejorar la activación de linfocitos T, es decir, producción de IL-2 en linfocitos T expuestos a estimulación de CD3 subóptimo de una manera dependiente de la concentración.

15.5 Caracterización funcional *in vitro* de anticuerpos agonistas contra TPBG-CD28 y CD30-CD28 en un ensayo de PBMC

La capacidad de TPBG(5T4)-CD28 (molécula 14D) y CD30-CD28 (molécula 14C) para mejorar la activación de linfocitos T mediada por estimulación anti-CD3 se evaluó con linfocitos T de PBMC primarias de donantes sanos como células efectoras y células diana que expresaban 5T4, tales como JIMT-1, NCI-H1975, NCI-N87, y células Calu-1, o células diana que expresaban CD30, tales como KARPAS-299, respectivamente. En dicho ensayo, 1E4 células diana tumorales se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 5 días a 37 °C con 1E5 (E:T 10:1) en presencia de concentración subóptima de anti-CD3 (eBioscience #16-0037-85, clon OKT3) solo o en combinación con concentraciones en aumento de los constructos agonistas de CD28 (24 pM – 100 nM). La funcionalidad de las moléculas que actúan sobre CD28 se evaluó mediante citometría de flujo, que medía marcadores de activación de linfocitos T (CD25, CD69) y proliferación de linfocitos T (dilución de CFSE).

Ejemplo 16

Generación y producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)

16.1 Clonación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)

Para la generación de los plásmidos de expresión, las secuencias de los respectivos dominios variables se usaron y se subclonaron en la estructura con las respectivas regiones constantes preinsertadas en el respectivo vector de expresión mamífero receptor. En el dominio Fc, se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a receptores Fc gamma de acuerdo con el método descrito en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2012/130831. Para la generación de anticuerpos biespecíficos, los fragmentos Fc contenían las mutaciones “botón” (mutaciones S354C/T366W, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat) o mutaciones “ojal” (mutaciones Y349C/T366S/L368A/Y407V de acuerdo con el índice EU de Kabat) para evitar el error de apareamiento de las cadenas pesadas. A fin de evitar el error de apareamiento de las cadenas livianas en las moléculas biespecíficas de unión al antígeno, un intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa se introdujo en una porción de unión (tecnología CrossFab). En otra porción de unión, se introdujeron cargas en los dominios CH1 y Ckappa como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/150447.

El anticuerpo anti-GPRC5D 5E11 es una versión humanizada de clon 5E11 como se describe en WO 2019/154890 A1. Los anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, daratumumab, se divulgan en WO 2006/99875 A1. La generación y preparación de anticuerpos anti-BCMA se describe en WO 2016/166629 A1.

Las siguientes moléculas se clonaron, una ilustración esquemática de estas se muestra en las **figuras 37A a 37C**:

Molécula 16A: formato GPRC5D (5E11)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28 (SA_Variante 15) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento GPRC5D (5E11) Fab (ojal) (**figura 37A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 366, 367, 398 y 399 (P1AF1272).

Molécula 16B: formato GPRC5D (5E11) -CD28 (SA_Variante 8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento GPRC5D (5E11) Fab (ojal) (**figura 37A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 364, 365, 398 y 399 (P1AF2954).

Molécula 16C: formato CD38 (daratumumab)-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones cargadas en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) e intercambio VH/VL en el fragmento anti-CD38 Fab (ojal) (**figura 37B**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 357, 358, 400 y 401 (P1AE9038).

Molécula 16D: formato anti-BCMA-CD28 (SA_Variante 15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con intercambio VH/VL en el fragmento CD28(SA_Variante 15) Fab (botón) y modificaciones cargadas en el fragmento anti-BCMA Fab (ojal) (**figura 34A**) que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID Nos: 366, 367, 402 y 403 (P1AE9053).

16.2 Producción de las moléculas

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente era impulsada por un promotor de MPSV quimérico o un promotor de CMV. La poliadenilación era impulsada por una secuencia de señal poliA sintética ubicada en el extremo 3’ de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia EBV OriP para la replicación autosómica.

Los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos se generaron mediante transfección transitoria de células HEK293 EBNA o células CHO EBNA. Las células se centrifugaron y el medio se reemplazó por medio CD CHO precalentado (Thermo Fisher, Cat N.º 10743029). Los vectores de expresión se mezclaron en medio CD CHO, se agregó PEI (polietilenimina, Polysciences, Inc, Cat N.º 23966-1), la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células (2 Mio/ml) se mezclaron con solución PEI/vector, se transfirieron a un matraz y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con agitación con una atmósfera al 5 % de CO_2. Luego de la incubación, se agregó medio Excell con suplementos (80 % de volumen total) (W. Zhou y A. Kantardjieff, Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing, DOI: 10.1007/978-3-642-54050-9; 2014). Un día después de la transfección, se agregaron suplementos (alimentación, 12 % de volumen total). Los sobrenadantes celulares se recolectaron luego de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm), y las proteínas se purificaron del sobrenadante recolectado mediante métodos estándar como se indica a continuación.

De manera alternativa, los anticuerpos y anticuerpos biespecíficos descritos en la presente fueron preparados por Evitria usando el sistema de vectores de su propiedad con técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR) y usando células CHO K1 adaptadas a suspensión (originalmente recibidas de ATCC y adaptadas a crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria). Para la producción, Evitria usó medio sin suero y sin componentes animales de su propiedad (eviGrow y eviMake2) y el reactivo de transfección de su propiedad (eviFect). El sobrenadante se recolectó mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y las proteínas se purificaron del sobrenadante recolectado mediante métodos estándar

16.3 Purificación de las moléculas

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,5; amortiguador de elución: 20 mM de citrato de sodio, pH 3,0). La elución se logró a pH 3,0 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15 (Art.N.º: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

16.4 Datos analíticos de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28

La concentración de proteínas purificadas se determinó al medir la absorción a 280 nm, usando el coeficiente de extinción de masa calculado en función de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al*., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor usando un LabChipGXII o LabChip GX Touch (Perkin Elmer). La determinación del contenido agregado se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna de exclusión por tamaño analítica (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de L-Arginina monoclorhidrato, pH 6,7 o 200 mM de KH_2PO_4, 250 mM de KCl pH 6,2, respectivamente). Una síntesis de los parámetros de purificación de las moléculas se proporciona en la **tabla 37.**

Tabla 37: Síntesis de la producción y purificación de moléculas de unión al antígeno CD28 16A a 16D

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
16A	GPRC5D (5E11) - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	46,89	0,73 / 97,68 / 1,59	93,44
16B	GPRC5D (5E11) - CD28 (SA_Variante 8) 1+1	89,84	2,99 / 95,26 / 1,75	88,76
16C	CD38 (Daratumumab)- CD28 (SA_Variante 15) 1+1	56,55	0,29 / 99,71 / 0	93,96
16D	BCMA - CD28 (SA_Variante 15) 1+1	87,6	1,75 / 98,25 / 0	94,33

Ejemplo 17

Caracterización funcional *in vitro* de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM)

17.1 Unión de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y un antígeno de superficie celular de mieloma múltiple (MM) a células que sobreexpresan la diana indicada

A fin de medir la unión a GPRC5D, BCMA, CD38 o CD28 se realizó un ensayo de unión basado en FACS en una línea de células de mieloma múltiple informada (Lombardi *et al*., Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the diseas; Genes Chromosomes Cancer. 2007, 46(3), 226-38) o transfectantes de CHO, que se transdujeron para sobreexpresar de manera estable GPRC5D humano o CD28 humano: se evaluó la unión a BCMA, usando células IM-9 (ATCC ® CCL-159), se evaluó la unión a CD38, usando células OCI-Ly18 (DSMZ ACC 699), se evaluó la unión a GPRC5D, usando células CHO-hGPRC5D, y se evaluó la unión a CD28, usando células CHO-hCD28.

IM-9 y OCI-Ly18 se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes, los transfectantes de CHO estables (línea celular de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61) se cultivaron en F-12K, enriquecido con 10 % de FCS. Brevemente, las células en suspensión se recolectaron, se contaron y se evaluaron para determinar su viabilidad. Las células CHO adherentes se separaron usando amortiguador de disociación celular (Gibco), se contaron y se evaluaron para determinar su viabilidad. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4 °C.

Las células se lavaron en amortiguador FACS una vez (PBS, 2 % suero bovino fetal; 1 % 0,5 m EDTA pH 8; 0,25 % NaN_3 azida de sodio) y se volvieron a suspender en amortiguador FACS a 1 células Mio por ml. 0,1 células Mio se colocaron en cada cavidad de una placa de 96 cavidades de fondo redondo, se lavaron con amortiguador FACS una vez más, y los sobrenadantes se descartaron. Las células se tiñeron en un volumen total de 50 ul por cavidad y concentraciones en aumento de las moléculas biespecíficas CD28 indicadas (0,07 – 300 nM) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS y se incubaron durante 30 min a 4 °C en un total de 25 ul por cavidad, que contenían el anticuerpo secundario prediluido (Alexa Fluor 488-AffiniPure F(ab')2 Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson

Immunoresearch, 109-546-008, con dilución 1:100 en amortiguador FACS, respectivo 109-606-008 PE, Jackson Immunoresearch, con dilución 1:100 en amortiguador FACS, como se indicó). Las células se lavaron dos veces y se analizaron en un citómetro de flujo BD Fortessa, equipado con el *software* FACS Diva. Las curvas de unión y valores de EC_{50} se obtuvieron usando GraphPadPrism6.

Las figuras 38A a 38F muestran que todas las moléculas biespecíficas CD28 eran capaces de unirse a ambos, CD28 humano (A), así como la segunda diana respectiva, es decir, CD38 humano, BCMA humana o GPRC5D humano de una manera dependiente de la concentración. Brevemente, la molécula GPRC5D-CD28 tenía la EC_{50} más baja para para la unión a CD28 humano (tabla 37), pero alcanzaba una unión máxima más baja en comparación con las otras dos moléculas biespecíficas CD28.

Ambas moléculas CD28 que actúan sobre CD38 y BCMA mostraron unión dependiente de la concentración a CD38 y BCMA respectivamente, y alcanzaron la saturación en el rango de concentración evaluado (los valores de EC_{50} de unión se resumen en la tabla 38). Por el contrario, la molécula GPRC5D-CD28 se unía de una manera dependiente de la concentración, pero no alcanzó la saturación en el mismo rango de concentración, lo que indicó una afinidad menor de GPRC5D en comparación con el aglutinante de CD38 o BCMA, incluido en estas moléculas.

Tabla 38: Valores EC50 (nM) para unión de las moléculas biespecíficas CD28 indicadas de CD28 humano o los respectivos antígenos que actúan sobre MM, que se expresan en células

Molécula	**EC_{50} de unión a CD28 (nM)**	**EC_{50} de unión a CD38/BCMA/GPRC5D (nM)**
CD38-CD28	26,8	4,3
BCMA-CD28	9,9	3,96
GPRC5D-CD28 (SA_variante 15)	4,7 - 5,2	no calculado
GPRC5D-CD28 (SA_ variante 8)	74,2	no calculado

17.2 Caracterización funcional *in vitro* con base en ensayo indicador de IL-2 (caracterización funcional de activación de linfocitos T)

A fin de evaluar la capacidad de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD38-CD28, BCMA-CD28 y GPRC5D-CD28 para soportar la activación de linfocitos T mediada por TCB, las células indicadoras de IL-2 (Promega, Cat. N.º J1651) se usaron como células efectoras (línea de linfocitos T Jurkat que expresan un indicador de luciferasa impulsado por el promotor de IL-2) y células NCI-H929, que eran positivas para CD38, BCMA, así como GPRC5D como dianas tumorales.

Brevemente, 5 x10^3 células diana tumorales se incubaron en placas de 384 cavidades de fondo plano blancas (353988 Falcon™ microplaca tratada con cultivo tisular de fondo plano de 384 cavidades) durante 5 h, respectivamente, 22 h a 37 °C con 2,5 x10^4 células indicadoras de IL-2 (E:T 5:1) en presencia de 1 nM de GPRC5D-TCB solo o en combinación con concentraciones en aumento de las moléculas biespecíficas CD28 (12,2 – 50 nM). Antes de la medición, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, y luego se agregaron 20 ul de sustrato (solución ONE-Glo, Promega, Cat. N.º E6120) a las células. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la luminiscencia (recuentos/s) se midió con un Tecan Spark 10M.

Como se ilustra en las figuras 39A a 39F, ninguna de las moléculas CD28 que actúan sobre MM inducen activación de células Jurkat indicadoras de IL2 en ausencia de una señal de TCB (línea gris brillante, figura 39A– 9F). Como se esperaba, con estas células indicadoras de IL-2, no se observó inducción significativa de activación de células indicadoras en presencia de 1 nM de GPRC5D TCB, ni en el punto temporal temprano (5 h) ni en el punto temporal tardío (después de 22 h).

No obstante, todas las moléculas que actuaban sobre MM fueron capaces de inducir una activación dependiente del tiempo y de la concentración significativa de células indicadoras de IL-2 en presencia de 1 nM de GPRC5D-TCB. Mientras que las moléculas CD38-CD28 y BCMA-CD28 eran capaces de inducir la activación de células indicadoras de IL2 a partir de 5 h (figura 39A y 39C), GPRC5D-CD28 alcanzó niveles máximos similares de activación solo en el punto temporal tardío evaluado (22 h, figura 39F), lo que indicó diferentes cinéticas de actividad.

El anticuerpo biespecífico anti-GPRC5D/anti-CD3 (GPRC5D TCB, **figura 37D**) usado en los experimentos se preparó de manera análoga a CEACAM5 TCB, como se describe en el ejemplo 8 y en WO 2016/079076 A1. GPRC5D TCB comprende las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:404 y SEQ ID NO:405.

17.3 Lisis mediada por linfocitos T de línea de células de mieloma múltiple

A fin de evaluar la capacidad de CD38-CD28, BCMA-CD28 y GPRC5D-CD28 para reforzar la lisis mediada por GPRC5D TCB de una línea de células de mieloma múltiple, 1,5 $x10^5$ linfocitos T pan efectores humanos se incubaron con $3x10^4$ células diana NCI-H929 en una relación final E:T de 1:1 durante alrededor de 22 h. Los linfocitos T pan se aislaron de PBMC mediante MACS, usando el kit de aislamiento de linfocitos T pan (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130-096-535) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. GPRC5D TCB se agregó en concentraciones en aumento (0,064 pM – 1 nM), las diferentes moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre MM se agregaron en una concentración fija de 0,2 nM. La lisis de células tumorales se evaluó como se muestra a continuación: Las placas de ensayo se centrifugaron durante 5 minutos y 50 ul de sobrenadante por cavidad se transfirieron a una nueva placa de 96 cavidades de fondo plano. Para la normalización, la lisis máxima de las células diana (= 100 %) se indujo mediante incubación de las células diana con una concentración final de 1 % de Triton X-100. La lisis mínima (= 0 %) se refiere a células diana coincubadas con células efectoras, pero sin ningún constructo biespecífico o TCB. Después de la incubación durante la noche de alrededor de 22 h a 37 °C, 5 % de CO_2, LDH la liberación de LDH de células diana apoptósicas/necróticas en el sobrenadante se midió usando el kit de detección de LDH (Roche Applied Science, #11 644 793 001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Como se ilustra en las figuras 40a a 40C, GPRC5D TCB induce la lisis dependiente de la concentración de células NCI-H929. Las tres moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre MM evaluadas fueron capaces de reforzar significativamente la eficacia en comparación con la monoterapia con TCB, al administrarse en una concentración fija de 0,2 nM. Además, ninguna de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actuaban sobre MM indujo la lisis de células tumorales en ausencia de TCB, lo que sustentó la dependencia de las moléculas que actúan sobre MM en la señal de TCB.

La tabla 39 resume los valores de EC_{50}, así como el área bajo la curva derivada de los datos que se muestran en las figuras 40A-40C. Los valores de EC_{50} se calcularon usando GraphPadPrism6.

Tabla 39: Valores de EC50 (nM) de inactivación mediada por anti-GPRC5D TCB

	GPRC5D TCB	+ CD38-CD28	+ BCMA-CD28	+ GPRC5D-CD28
EC_{50} lisis luego de 22 h (pM)	1,86	3,1	3,7	3,3
Área bajo la curva	21,3	44,8	46,3	46,8

Ejemplo 18

Generación y producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

18.1 Clonación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

La generación y preparación de anticuerpos contra CD19 se divulga en WO 2017/55541 A1 o WO 2017/55328 A1. En particular, el clon de CD19 2B11 se describe en WO 2017/55328 A1, que se incorpora en la presente por referencia. El clon de CD79b huMA79b.v28 (correspondiente a polatuzumab), como se usa en la presente, se describe en WO 2009/012268 A. Para la generación de los respectivos plásmidos de expresión, las secuencias de los respectivos dominios variables se usaron y se subclonaron en la estructura con las respectivas regiones constantes preinsertadas en el respectivo vector de expresión mamífero receptor. Una descripción esquemática de las moléculas resultantes se muestra en las **figuras 41A** y **41B**, respectivamente. Se introdujeron mutaciones Pro329Gly, Leu234Ala y Leu235Ala (PG-LALA) en la región constante de las cadenas pesadas de IgG1 humana para anular la unión a receptores Fc gamma. Para la generación de anticuerpos biespecíficos asimétricos, los fragmentos Fc contenían las mutaciones “botón” u “ojal” para evitar el error de apareamiento de las cadenas pesadas. A fin de evitar el error de apareamiento de las cadenas livianas en constructos de anticuerpo biespecífico y multiespecífico, un intercambio de dominios VH/VL o CH1/Ckappa se introdujo en una porción de unión (tecnología CrossFab). En otra porción de unión, se introdujeron cargas en los dominios CH1 y Ckappa.

Las siguientes moléculas se clonaron, una ilustración esquemática de estas se muestra

en las **figuras 41A** y **41B**:

Molécula 18A: CD19 (8B8-2B11) - CD28 (SA_v29) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v29 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD19 (2B11) Fab (ojal) **(figura 41A).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 118 y 430 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:65 y 431 (P1AE8002).

Molécula 18B: CD19 (8B8-2B11) - CD28 (SA_v15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v15 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD19 (2B11) Fab (ojal) **(figura 41A).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 116 y 430 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:121 y 431 (P1AE9040).

Molécula 18C: CD19 (8B8-2B11) - CD28 (SA _v8) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v8 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD19 (2B11) Fab (ojal) **(figura 41A).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 114 y 430 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:122 y 431 (P1AF0175).

Molécula D: CD19 (8B8-2B11) - CD28 (SA_v11) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v11 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD19 (2B11) Fab (ojal) **(figura 2B).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 114 y 430 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:65 y 431 (P1AF0377).

Molécula E: CD19 (8B8-2B11) - CD28 (SA_v27) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v27 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD19 (2B11) Fab (ojal) **(figura 2B).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 118 y 430 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:123 y 431 (P1AF0378).

Molécula F: CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (SA_v15) 1+1, molécula biespecífica huIgG1 PG-LALA CrossFab con modificaciones de carga en CD28 v15 Fab (botón) e intercambio VH/VL en CD79b (huMA79b.v28) Fab (ojal) **(figura 2C).** La molécula comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de SEQ ID NOs: 116 y 432 y las secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de SEQ ID NOs:121 y 433 (P1AE9039).

18.2 Producción de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

La expresión de las moléculas mencionadas anteriormente era impulsada por un promotor de CMV. La poliadenilación era impulsada por una secuencia de señal poliA sintética ubicada en el extremo 3' de la CDS. Además, cada vector contenía una secuencia EBV OriP para la replicación autosómica.

Para la producción de todos los constructos, células HEK293-EBNA que crecen en suspensión se cotransfectaron de manera transitoria con los respectivos vectores de expresión usando polietilenimina como reactivo de transfección. Las células se centrifugaron y el medio se reemplazó por medio CD CHO precalentado. Los vectores de expresión se mezclaron en medio CD CHO, se agregó PEI, la solución se agitó en vórtice y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se mezclaron con la solución PEI/ADN, se transfirieron a un matraz de agitación y se incubaron durante 3 horas a 37 °C en una incubadora con una atmósfera al 5 % de CO_2. Luego de la incubación, se agregó medio Excell con suplementos (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Un día después de la transfección, se agregaron suplementos (alimentación) (cultivos de células de mamífero para Biologics Manufacturing, Editores: Weichang Zhou, Anne Kantardjieff). Los sobrenadantes celulares se recolectaron luego de 7 días mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm) y se purificaron mediante métodos estándar.

18.3 Purificación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

Las proteínas se purificaron de sobrenadantes de cultivo celular filtrado de acuerdo con protocolos estándar. En resumen, las proteínas que contenían Fc se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad de proteína A (amortiguador de equilibrio: 20 mM de citrato de sodio, 20 mM de fosfato de sodio, pH 7,5; amortiguador de elución: 20 mM de citrato de sodio, pH 3,0). La elución se logró a pH 3,0 y luego neutralización inmediata de la muestra. La proteína se concentró mediante centrifugación (Millipore Amicon® ULTRA-15 (Art.N.º: UFC903096), y la proteína agregada se separó de la proteína monomérica mediante cromatografía de exclusión por tamaño en 20 mM de histidina, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6,0.

18.4 Datos analíticos de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

La concentración de proteínas de constructos purificados se determinó al medir la densidad óptica (OD) a 280 nm, usando el coeficiente de extinción de masa calculado en función de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace, *et al*., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423. La pureza y el peso molecular de las proteínas se analizaron mediante CE-SDS en presencia y ausencia de un agente reductor usando un LabChipGXII (Perkin Elmer). La determinación del contenido agregado se realizó mediante cromatografía HPLC a 25 °C usando una columna de exclusión por tamaño analítica (TSKgel G3000 SW XL o UP-SW3000) equilibrada en amortiguador de corrida (25 mM de K_2HPO_4, 125 mM de NaCl, 200 mM de L-Arginina monoclorhidrato, pH 6,7 o 200 mM de KH_2PO_4, 250 mM de KCl pH 6,2, respectivamente). Una síntesis de los parámetros de purificación de todas las moléculas se proporciona en la **tabla 40.**

Tabla 40: Síntesis de la producción y purificación de moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28

Molécula	Descripción	Rendimiento [mg/l]	SEC analítica (HMW/monómero/LMW) [%]	Pureza medida mediante CE-SDS [%]
18A	CD19 (2B11) - CD28 (v29) 1+1	24,9	1,45 / 98,55 / 0	96,25
18B	CD19 (2B11) - CD28 (v15) 1+1	45,05	0 / 99,1 / 0,9	98,78
18C	CD19 (2B11) - CD28 (v8) 1+1	22,06	2,08 / 96,67 / 1,25	93,11
18D	CD19 (2B11) - CD28 (v11) 1+1	40,9	0 / 98,9 / 1,1	97,1
18E	CD19 (2B11) - CD28 (v27) 1+1	41,7	0,49 / 98,9 / 0,61	90,9
18F	CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (v15) 1+1	20,6	1,31 / 98,34 / 0,35	94,43

Ejemplo 19

Análisis de unión y cinético de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19 o CD79b

19.1 Análisis cinético de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD79b

La afinidad (K_D) de huMA79b.v28 por CD79b-His recombinante (Sinobiological #29750-H08H) se midió mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) usando una máquina Biacore T200. Para la captura de CD79b-His, un anticuerpo anti-penta HIS se acopló a una célula de flujo de un chip CM5 mediante acoplamiento de aminas. Se usaron niveles de inmovilización de alrededor de 5000 unidades. Luego, CD79b-His se diluyó hasta una concentración de 1 nM y se capturó mediante el anticuerpo anti-penta HIS durante 10 s a una velocidad de flujo de 10 μl/min.

Para la determinación de la afinidad (K_D) de la molécula F purificada (CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (SA_variante 15) 1+1) una dilución en serie de dos veces de la molécula de unión al antígeno purificada (rangos de concentración que variaban entre 125 y 0,49 nM) se inyectó a 30 µL/min con un tiempo de asociación de 180 s y un tiempo de disociación de 400 s. Amortiguador HBS-EP$^+$ (GE-Healthcare amortiguador estándar BR-1006-69 diluido 1:10) se inyectó para referencia. La regeneración se realizó con 10 mM de glicina pH 2,1 durante 2x60 s. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon usando a modelo de unión de Langmuir simple uno a uno mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación (**figura 42**). La constante de disociación de equilibro (KD) se calculó como la relación k_{off}/k_{on}. Los resultados se muestran en la tabla 41. La afinidad de la molécula F (CD79b (huMA79b.v28) - CD28 (SA_variante 15) 1+1) por CD79b-His es 76 nM.

Tabla 41: Caracterización de unión de huMA79b.v28 a CD79b-His recombinante soluble

clon	**k on (1/Ms)**	**k off (1/s)**	**K_D (nM)**
huMA79b.v28	2,57E+5	1,95E-2	76

19.2 Análisis cinético de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28

La afinidad de (K_D) de las moléculas biespecíficas de unión al antígeno producidas por CD28 se midió mediante SPR usando un instrumento ProteOn XPR36 (Biorad) a 25 °C con antígeno huCD28-Fc biotinilado inmovilizado en chips NLC mediante captura de neutravidina. Inmovilización de antígenos recombinantes (ligando): El antígeno se diluyó con PBST (10 mM de fosfato, 150 mM de cloruro de sodio pH 7,4, 0,005 % de Tween 20) hasta 10 µg/ml, luego se inyectó a 30 µL/minuto en diversos tiempos de contacto, para lograr niveles de inmovilización de alrededor de 200, 400 u 800 unidades de respuesta (RU) en orientación vertical. Inyección de analitos: Para las mediciones cinéticas de una etapa, la dirección de inyección se cambió por orientación horizontal, se inyectaron series de dilución de dos veces de variantes biespecíficas de afinidad anti-CD28 que actúan sobre CD19 purificadas (rangos de concentración que variaban entre 50 y 3,125 nM) de manera simultánea a 50 µL/min a lo largo de canales separados 1-5, con tiempos de asociación de 150 s, y tiempos de disociación de 450 s. Se inyectó amortiguador (PBST) a lo largo del sexto canal para proporcionar un blanco “en línea” para referencia. Las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) se calcularon usando un modelo de unión de Langmuir simple uno a uno en un *software* ProteOn Manager v3.1 mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la relación k_{off}/k_{on}. Los clones analizados revelaron valores de K_D en un rango amplio (entre 1 y 50 nM).

Ejemplo 20

Unión de moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 a células que expresan CD28 y CD19 o CD79b

La unión a CD28 humano se evaluó mediante células CHO que expresaban CD28 humano (línea de células de origen CHO-k1 ATCC #CCL-61, modificada para sobreexpresar de manera estable CD28 humano). A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a $2{,}5x10^5$/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat. N.º 00-4222-26). $5x10^4$ células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 2 h a 4 °C con concentraciones en aumento de aglutinantes de CD28 (1 pM–100 nM). Luego, las células se lavaron tres veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 60 min más a

4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron una vez con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 100 ul de amortiguador FACS. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism6.

Los constructos variantes de CD28 tipo IgG de un brazo monovalente presentaron diferencias en la unión, como se puede observar a partir de las **figuras 4A a 4C**.

La unión a CD19 y CD79b se evaluó usando líneas de linfocitos B que expresaban diferentes niveles de CD19 y CD79b: Nalm6 (DSMZ #ACC 128), RCK8 (DSMZ #ACC 561), WSU DLCL2 (DSMZ #ACC 575) y Z138 (regalo de M. Dyer, Univ. of Leicester).

A fin de evaluar la unión, las células se recolectaron, se contaron, se evaluaron para determinar su viabilidad y se volvieron a suspender a 0,5 células Mio/ml en amortiguador FACS (eBioscience, Cat N.º 00-4222-26). 5E4 células se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 1 h a 4 °C con concentraciones en aumento de los constructos CD19-CD28 (o CD79b-CD28) (10 pM – 500 nM). Luego, las células se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se incubaron durante 30 min más a 4 °C con anti-PE humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoReserach, Cat N.º 109-116-098), se lavaron dos veces con amortiguador FACS frío, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 85 ul de amortiguador FACS con DAPI (Roche, Cat. N.º 10236276001) con dilución 1:10000. Para controlar las interacciones de unión no especifica entre constructos y células, una IgG anti-DP47 se incluyó como control negativo. La unión se evaluó mediante citometría de flujo con FACS Fortessa (BD, *Software* FACS Diva). Las curvas de unión se obtuvieron usando GraphPadPrism7. Una comparación de la unión de CD19-CD28 v15 a las diferentes líneas de linfocitos B se muestra en las **figuras 43A** y **43B**.

Análisis FACS

A fin de evaluar el nivel relativo de CD19 en la superficie de las líneas de linfocitos B (Nalm6, RCK8, WSU DLCL2 y Z138), las células se bloquearon en Fc antes de la tinción usando bloqueo de Fc humano (BD, Cat. N.º 564220), luego, 2x 10^5 células se centrifugaron a 480 xg durante 5 min y se lavaron con PBS. La tinción superficial para CD19 (BV650 anti-humano, BioLegend #302238) se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron una vez con 150 µl/cavidad de PBS y

se volvieron a suspender en 150 μl/cavidad de PBS y se analizaron usando BD FACS Fortessa.

Los ensayos de unión celular *in vitro* verificaron que todos los anticuerpos agonistas contra CD19-CD28 se unieran a CD19 humano así como a CD28 humano en células de una manera dependiente de la concentración (**figuras 44A** y **44B**). Como se esperaba, no se detectó unión con IgG anti-DP47, lo que indicó que la detección de unión se debía a la unión a CD28 y CD19 específica por parte de las respectivas porciones de direccionamiento. Los valores de EC_{50} para la unión a CD28 se muestran en la tabla 42, y los valores de EC_{50} para la unión a CD19 se muestran en la tabla 43.

Tabla 42: Valores de EC_{50} de anticuerpos agonistasCD19-CD28 para unión a CD28

ID	**Moléculas**	**EC_{50} (nM)**
P1AF0175	CD19-CD28 v8	232
P1AF0377	CD19-CD28 v11	150,4
P1AE9040	CD19-CD28 v15	15,55
P1AF0378	CD19-CD28 v27	10,75
P1AE8002	CD19-CD28 v29	6,646

Tabla 43: Valores de EC_{50} de anticuerpos agonistasCD19-CD19 para unión a CD28

ID	**Moléculas**	**EC_{50} (nM)**
P1AF0175	CD19-CD28 v8	0,2324
P1AF0377	CD19-CD28 v11	0,3631
P1AE9040	CD19-CD28 v15	0,416
P1AF0378	CD19-CD28 v27	0,368
P1AE8002	CD19-CD28 v29	0,2742

Ejemplo 21

Caracterización funcional *in vitro* de moléculas biespecíficas agonistas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre CD19 o CD79b

Varios ensayos celulares *in vitro* se realizaron con PBMC humanas primarias para evaluar la actividad de CD28(SA) y moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD28 que actúan sobre CD19 o CD79b en presencia y ausencia de señales de TCR proporcionadas por anticuerpos biespecíficos de linfocitos T (TCB). La proliferación de linfocitos T, la secreción de citocina y la inactivación de células tumorales determinadas mediante citometría de flujo, ELISA de citocina y generación de imágenes de células vivas se obtuvieron como lecturas.

Aislamiento de PBMC

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se prepararon mediante centrifugación de gradiente de densidad a partir de preparaciones de linfocitos enriquecidos de sangre heparinizada obtenida de capa leucocítica (Blutspende Zürich). 25 ml de sangre (diluidos 1:2 en PBS) se colocaron en capas sobre 15 ml de Lymphoprep (STEMCELL technologies, Cat. N.º 07851) y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 25 min a 845 xg sin freno. La interfase que contiene PBMC se recolectó en tubos de 50 ml con una pipeta de 10 ml. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron durante 5 min a 611 xg. El sobrenadante se descartó, el pelet se volvió a suspender en 50 ml de PBS y se centrifugó durante 5 min a 304 xg. La etapa de lavado se repitió, con centrifugación a 171 xg. Las células se volvieron a suspender en RPMI 1640 Glutamax (que contenía 5 % de suero humano, piruvato de sodio, NEAA, 50 μM de 2-mercaptoetanol, penicilina/estreptomicina) y se procesaron para análisis funcional adicional de acuerdo con el protocolo de ensayo respectivo.

Caracterización funcional *in vitro* de moléculas CD19-CD28 y CD79b-CD28 con base en ensayo indicador de IL-2

A fin de evaluar la capacidad de CD19-CD28 y CD79b-CD28 para soportar la activación de linfocitos T mediada por TCB, las células indicadoras de IL-2 (Promega, Cat. N.º J1651) sirvieron como células efectoras (línea de linfocitos T Jurkat que expresa un indicador de luciferasa impulsado por el promotor de IL-2) y Nalm6, RCK8, WSU DLCL2 y Z138 sirvieron como dianas tumorales. $2x10^4$ células diana tumorales se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo blanco durante 6 h a 37 °C con 10^5 células

indicadoras de IL-2 (E:T 5:1) en presencia de concentraciones subóptimas de CD20-TCB (P1AD4071) (10 nM para Nalm6 o 0,05 nM para RCK8, WSU DLCL2 y Z138) solo o en combinación con concentraciones en aumento de los constructos CD19-CD28 (o CD79b-CD28) (0,2 pM – 10 nM). Antes de la medición, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min, y luego se agregaron 100 ul de sustrato (solución ONE-Glo, Promega, Cat. N.º E6120) a las células. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, la luminiscencia (recuentos/s) se midió con un Tecan Spark 10M.

Caracterización funcional *in vitro* de CD19-CD28 con base en activación de linfocitos T aislados de PBMC

A fin de evaluar la capacidad de CD19-CD28 para soportar la activación de linfocitos T mediada por TCB, los linfocitos T pan se usaron como células efectoras y se aislaron de PBMC mediante MACS, usando el kit de aislamiento de linfocitos T pan (Miltenyi Biotec, Cat. N.º 130-096-535) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y Nalm6, RCK8, WSU DLCL2 y Z138 sirvieron como dianas tumorales. $2x10^4$ células diana tumorales se incubaron en placas de 96 cavidades de fondo redondo durante 48 h a 37 °C con 10^5 linfocitos T pan (E:T 5:1) en presencia de concentraciones subóptimas de CD20-TCB (P1AD4071) (10 nM para Nalm6 o 0,05 nM para RCK8, WSU DLCL2 y Z138) solo o en combinación con concentraciones en aumento de los constructos CD19-CD28 (0,2 pM – 10 nM). La activación de linfocitos T se evaluó mediante citometría de flujo. Brevemente, las células se centrifugaron a 480 xg durante 5 min y se lavaron con PBS. La tinción superficial para CD8 (BV421 anti-humano, BioLegend #301036), CD4 (PE-Cy7 anti-humano, BioLegend #344611), CD25 (BV605 anti-humano, BioLegend #302632), CD69 (PE anti-humano, BioLegend #310906) se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Las células se lavaron una vez con 150 ul/cavidad de PBS y se volvieron a suspender en 150 ul/cavidad de PBS y se analizaron usando BD FACS Fortessa.

Evaluación de liberación de citocina

A fin de evaluar la capacidad de CD19-CD28 para desencadenar la liberación de citocina en presencia de señalización de TCR, $5x10^5$ PBMC se incubaron en placas de 96 cavidades con fondo en forma de U durante 48 h a 37 °C en presencia de CD19-CD28 (1 nM) y una concentración subóptima de CD20-TCB (P1AD4071) (0,4 pM). A fin de evaluar la capacidad de CD19-CD28 para desencadenar la liberación de citocina en ausencia de señalización de TCR, $5x10^5$ PBMC se incubaron en placas de 96 cavidades

con fondo en forma de U durante 48 h a 37 °C en presencia de concentraciones en aumento de los constructos CD19-CD28 (0,08 nM – 100 nM). La liberación de citocina se evaluó mediante ensayo múltiple. 50 µl/cavidad de sobrenadante se cribaron para determinar la secreción de G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, MCP-1 (MCAF), MIP-1β y TNF-α usando el ensayo Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex (Bio-rad, Cat. N.º m5000031yv) de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

CD19-CD28 mejora la activación de linfocitos T mediada por CD20-TCB en diversas líneas de linfocitos B

A fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos contra CD19-CD28 para mejorar la función efectora mediada por CD20-TCB, se evaluó la activación de linfocitos T en combinación con TCB. Con este fin, células Jurkat indicadoras de IL-2 se cocultivaron con cuatro diferentes líneas de células que expresan CD19 (Nalm6, WSU DLCL2, Z138, RCK8) durante 6 h en presencia de concentraciones en aumento de CD19-CD28 v15 (P1AE9040) y una concentración limitante fija de CD20-TCB (P1AD4071). CD20 TCB es un anticuerpo biespecífico anti-CD20/anti-CD3 en un formato 2+1 como se describe en el ejemplo 1 de WO 2016/020309 A1. Como se ilustra en las **figuras 45A a 45D**, CD19-CD28 aumenta la función efectora mediada por CD20-TCB en presencia de las cuatro líneas de linfocitos B de una manera dependiente de la concentración.

Las variantes de aglutinante de CD28 de afinidad reducida son funcionales *in vitro* en un formato biespecífico CD19-CD28

El clon CD28(SA) original tiene una afinidad de K_D =1 nM. Los clones de anticuerpo de afinidad alta conllevan el riesgo de someterse a efectos de hundimiento periférico, en especial, si la diana está altamente expresada en sangre periférica, como es el caso de CD28. A fin de (i) reducir los efectos de hundimiento periférico, y (ii) reducir el riesgo de activación de linfocitos T periférica a través de la unión fuera de tumor de agonistas de CD28 dirigidos a linfocitos T, se generó una serie de 31 clones de CD28 con afinidades reducidas al introducir mutaciones puntuales en las CDR (ver ejemplo 1.1). Los clones candidatos se seleccionaron como se describió previamente. Se generaron 5 moléculas con diferentes afinidades de CD28 en el formato biespecífico que actúa sobre CD19: CD19-CD28 v8 (P1AF0175), CD19-CD28 v11 (P1AF0377), CD19-CD28 v15 (P1AE9040), CD19-CD28 v27 (P1AF0378) y CD19-CD28 v29 (P1AE8002). Las **figuras 44A** y **44B** muestran que todas las moléculas CD19-CD28 generadas se unían a CD19 humano así

como a CD28, y las intensidades de unión se correlacionaban con las afinidades del aglutinante.

A fin de evaluar si las variantes de clon de CD28 de afinidad reducida eran funcionales y capaces de soportar funciones efectoras mediadas por TCB, se evaluó la activación de linfocitos T en combinación de TCB. Con este fin, células Jurkat indicadoras de IL-2 se cocultivaron con células Nalm6 que expresaban CD19 durante 6 h en presencia de concentraciones en aumento de CD19-CD28 y una concentración limitante fija de CD20-TCB. Como se ilustra en la **figura 46**, todas las variantes de los aglutinantes de CD28 eran funcionales y capaces de aumentar la activación de linfocitos T mediada por TCB de una manera dependiente de la concentración. Se usaron linfocitos T pan como células efectoras y se aislaron de PBMC mediante MACS, usando el kit de aislamiento de linfocitos T pan (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

CD19-CD28 no activa los linfocitos T de PBMC en ausencia de señales de TCR

Para confirmar que los constructos CD19-CD28 constructos estaban inactivos sin una señal de TCR, tal como la proporcionada por CD20-TCB, se evaluó el estado de activación de linfocitos T derivados de PBMC luego del cocultivo con células diana que expresaban CD20 (Nalm6) y CD19-CD28 en ausencia o presencia de CD20-TCB. Como se ilustra en la **figura 47**, CD19-CD28 mejora la expresión de CD69 mediada por CD20-TCB en linfocitos T de PBMC de una manera dependiente de la dosis, mientras que, en ausencia de TCB, CD19-CD28 no produce la activación de linfocitos T, incluso en concentraciones altas (100 nM). Este descubrimiento se confirma con la observación de que CD19-CD28 no produjo liberación de citocina en linfocitos T derivados de PBMC después de la coincubación con CD19-CD28 v8 o CD19-CD28 v15 en presencia o ausencia de CD20-TCB (**figuras 48A** a **48D**). En conclusión, estos datos confirmaron que CD19-CD28 no es un anticuerpo superagonista pero requiere una señal de TCR, es decir, proporcionada por TCB, para mejorar la activación de linfocitos T.

CD79b-CD28 mejora la activación de linfocitos T mediada por CD20-TCB

Además de los anticuerpos agonistas contra CD28 que actúan sobre CD19, también se generaron anticuerpos contra CD28 que actúan sobre CD79b a fin de evaluar su capacidad para mejorar la activación de linfocitos T mediada por CD20-TCB. Para esto, se usó la línea de linfocitos B positivos para CD79b Z138. Como se muestra en la **figura 49A**, CD79b-CD28 se unía a Z138. Además, CD79b-CD28 fue capaz de mejorar la producción de IL-2 mediada por CD20-TCB de células Jurkat IL-2 al incubarse con Z138

en presencia de 0,05 nM de CD20-TCB (**figura 49B**).

Ejemplo 22

Caracterización funcional *in vivo* de moléculas biespecíficas de unión al antígeno que actúan sobre CD28 y CD19

Estudio de eficacia con moléculas biespecíficas de unión al antígeno CD19-CD28 con diferentes variantes de CD28 en xenoinjerto de NALM6 en ratones humanizados

El estudio de eficacia descrito en la presente buscaba evaluar qué variante de CD28 en la molécula biespecífica de unión al antígeno CD19-CD28 produciría una inhibición de crecimiento tumoral más fuerte en la monoterapia en un modelo de linfoma humano positivo para CD19 en ratones NSG totalmente humanizados.

Las células NALM6 humanas (leucemia de precursores de linfocitos B) se obtuvieron originalmente de ATCC y luego de la expansión se depositaron en el banco de células interno de Glycart. Las células se cultivaron en RPMI que contenía 10 % de FCS y 1x Glutamax. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua al 5 % de CO_2. 50 microlitros de suspensión celular ($1x10^6$ células NALM6) mezclados con 50 microlitros de Matrigel se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones anestesiados con una aguja de 22 G a 30 G.

Los ratones NSG hembra, de 4-5 semanas de edad al inicio del experimento (Jackson Laboratory), se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos con ciclos diarios de 12 h de luz/12 h de oscuridad de acuerdo con las pautas previstas (GV-Solas; Felasa; TierschG). El protocolo de estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH225-17). Luego de su llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para que se acostumbraran al nuevo entorno y para observación. Se realizó un control continuo de la salud de manera regular.

A los ratones NSG hembra se les inyectó i.p. con 15 mg/kg de busulfán y un día después se les dio una inyección i.v. de $1x10^5$ células madre hematopoyéticas humanas aisladas de sangre del cordón umbilical. En la semana 14-16 luego de la inyección de células madre, se extrajo sangre de los ratones de manera sublingual y la sangre se analizó mediante citometría de flujo para la humanización exitosa. Los ratones injertados eficazmente se aleatorizaron de acuerdo con sus frecuencias de linfocitos T humanos en los diferentes grupos de tratamiento. En ese momento, los ratones se inyectaron con

células tumorales s.c. como se describió (**figura 50**) y se trataron con los compuestos o amortiguador de histidina (vehículo) cuando el tamaño del tumor alcanzó alrededor de 150 mm^3 (día 18). Todos los ratones se inyectaron i.v. con 200 µl de la solución adecuada. A fin de obtener la cantidad adecuada de compuestos por 200 µl, las soluciones de reserva (tabla 44) se diluyeron con amortiguador de histidina de ser necesario.

Tabla 4: Composiciones usadas en el experimento *in vivo*

Compuesto	Amortiguador de formulación	Concentración (mg/ml)
CD19-CD28 (variante15)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	5,63 (= solución de reserva)
CD19-CD28 (variante 8)	20 mM de Histidina, 140 mM de NaCl, pH6,0	3,53 (= solución de reserva)

El crecimiento tumoral se midió dos veces por semana usando un calibrador y el volumen tumoral se calculó como se muestra a continuación:

Tv: $(W^2/2) \times L$ (W: ancho, L: longitud)

El estudio finalizó en el día 53. La **figura 51A** muestra la cinética de crecimiento tumoral (media, +SEM) y las **figuras 51B** a **51D** muestran la cinética de crecimiento tumoral individual por grupo y ratón. Como se describe en la presente, CD19-CD28 variante 8, como un agente único, indujo una inhibición del crecimiento tumoral más fuerte en comparación con CD19-CD28 variante 15. Un vehículo animal debió sacrificarse de manera temprana debido a la formación de metástasis luego de la inyección s.c. de células tumorales. El efecto monoterapéutico en ratones humanizados puede explicarse por el refuerzo de los linfocitos T humanos aloeractivos, que se pueden considerar como un sustituto para el reconocimiento de neoantígenos, en el sistema de ratón.

***

Referencias:

Acuto, O. y Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Rev Immunol 3, 939-951.

Atamaniuk, J., Gleiss A., Porpazcy E., Kainz B., Grunt T.W., Raderer M., Hilgarth B., Drach J., Ludwig H., Gisslinger H., Jaeger U., Gaiger A. (2012). Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. Eur J Clin Invest. 42(9), 953-60.

Bahlis N.J., King A.M., Kolonias D. Carlson L.M., Liu H.Y., Hussein M.A., Terebelo H.R., Byrne G.E. Jr, Levine B.L., Boise L.H., Lee K.P. (2007). CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. Blood 109 (11), 5002–5010.

Boomer, J.S., y Green, J.M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a002436.

Bräuner-Osborne H., Jensen A.A., Sheppard P.O., Brodin B., Krogsgaard-Larsen P., O'Hara P. (2001). Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. Biochim. Biophys. Acta 1518(3), 237-48.

Carreno, B.M. y Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. Annu Rev Immunol 20, 29-53.

Chen, L. y Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol 13, 227-242.

Cho S.F., Anderson K.C., Tai Y.T. (2018). Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. Front Immunol. 9, 1821.

Cohen Y., Gutwein O., Garach-Jehoshua O., Bar-Haim A., Kornberg A. (2013). GPRC5D is a promising marker for monitoring the tumor load and to target multiple myeloma cells. Hematology 18(6), 348-51.

Engelhardt, J.J., Sullivan, T.J. y Allison, J.P. (2006). CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through a CD28-B7-dependent mechanism. J Immunol 177, 1052-1061.

Esensten, J.H., Helou, Y.A., Chopra, G., Weiss, A. y Bluestone, J.A. (2016). CD28

Costimulation: From Mechanism to Therapy. Immunity 44, 973-988.

Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. y Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. Science 251, 313-316.

Gao Y., Wang X., Yan H., Zeng J., Ma S., Niu Y., Zhou G., Jiang Y., Chen Y. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of Fetal Skin Reveals Key Genes Related to Hair Follicle Morphogenesis in Cashmere Goats. PLoS One 11(3), e0151118.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I. y Vale, R.D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science 355, 1428-1433.

Hunig, T. (2012). The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. Nat Rev Immunol 12, 317-318.

Inoue, S., Nambu T. y Shimomura T. (2004). The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. J Invest Dermatol. 122(3), 565-73.

June, C.H., Ledbetter, J.A., Gillespie, M.M., Lindsten, T. y Thompson, C.B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. Mol Cell Biol 7, 4472-4481.

Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., *et al*. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. Science 355, 1423-1427.

Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E.D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C.D., Levine, J.H., *et al*. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. Cell 169, 750-765 e717.

Linsley, P.S., Clark, E.A. y Ledbetter, J.A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 5031-5035.

Moreau, P. y S.V. Rajkumar (2016). Multiple myeloma-translation of trial results into reality. Lancet, 388(10040): p. 111-113.

Murray M.E., Gavile C.M., Nair J.R., Koorella C., Carlson L.M., Buac D., Utley A., Chesi M., Bergsagel P.L., Boise L.H., Lee K.P. (2014). CD28-mediated pro-survival signaling

induces chemotherapeutic resistance in multiple myeloma. Blood 123 (24), 3770 – 3779.

Römer, P.S., Berr, S., Avota, E., Na, S.Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H. y Hunig, T. (2011). Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. Blood 118, 6772-6782.

Tai, X., Van Laethem, F., Sharpe, A.H. y Singer, A. (2007). Induction of autoimmune disease in CTLA-4-/- mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 13756-13761.

Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M. y June, C.H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 1333-1337.

Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., *et al*. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. Science 352, 189-196.

Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., *et al*. (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. Cell 169, 1342-1356 e1316.